



Etude comparative des thérapies anti-VIH : rôle des transporteurs d'efflux sur le passage transmembranaire des antirétroviraux au niveau des cellules CD4+ et de la barrière hémato-encéphalique.

Laurence Bousquet

► To cite this version:

Laurence Bousquet. Etude comparative des thérapies anti-VIH : rôle des transporteurs d'efflux sur le passage transmembranaire des antirétroviraux au niveau des cellules CD4+ et de la barrière hémato-encéphalique.. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris Sud - Paris XI, 2008. Français. NNT : . tel-00364246

HAL Id: tel-00364246

<https://theses.hal.science/tel-00364246>

Submitted on 25 Feb 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS XI
FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY
Ecole doctorale Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué
Pôle Pharmacologie Expérimentale et Clinique

Année 2008

Série doctorat N°

THÈSE

Présentée
A l'Institut National des Sciences et Techniques Nucléaires
CEA de Saclay

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI

par
Laurence BOUSQUET

ÉTUDE COMPARATIVE DES THÉRAPIES ANTI-VIH :
Rôle des transporteurs d'efflux sur le passage transmembranaire des antirétroviraux
au niveau des cellules CD4+ et de la barrière hémato-encéphalique

Soutenue le 5 septembre 2008

JURY :	Mme le Professeur Dominique BREILH	Rapporteur
	M. le Docteur Stéphane ORLOWSKI	Rapporteur
	M. le Docteur Pascal CLAYETTE	Examineur
	M. le Professeur Pierre-Marie GIRARD	Examineur
	M. le Docteur Aloïse MABONDZO	Examineur
	M. le Professeur Robert FARINOTTI	Directeur de Thèse

Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisées au CEA de Saclay, au sein du Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse. Ils ont été financés par une bourse d'étude allouée par l'Agence Nationale de Recherche sur le SIDA (ANRS).

Je tiens à remercier le Dr Christophe Créminon, chef de service, et le Dr Eric Ezan, chef de laboratoire, pour m'avoir accueillie au sein de leur équipe et permise de mener à bien cette thèse.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Mme le Professeur Dominique Breilh et à M. le Docteur Stéphane Orłowski pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Je remercie M. le Professeur Pierre-Marie Girard et M. le Docteur Pascal Clayette pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie M. le Professeur Robert Farinotti pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse, ainsi que le Docteur Aloïse Mabondzo pour m'avoir encadré durant ces trois années de thèse.

Un grand merci également à tous les membres du SPI, qu'ils soient au rez-de-chaussée, au premier ou au second étage, pour leur bonne humeur, leur disponibilité et leur soutien. Et un merci plus particulier à mes compagnons de thèse depuis trois ans (Elodie, Alexandra, Matthieu et Erwan) et mes collègues de bureau qui se sont succédés au fil des années (Evanne, Stéphanie, Anne-Cécile et Iva).

Table des matières

ABBREVIATIONS	5
LISTE DES ILLUSTRATIONS	8
LISTE DES TABLEAUX	11
AVANT-PROPOS	12
OBJECTIFS GENERAUX	14

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE 1 : Le virus de l'immunodéficience humaine	18
1- Epidémiologie de l'infection à VIH	18
1-1- Analyse phylogénétique	18
1-2- L'épidémie à l'échelle mondiale	18
2- Historique des découvertes	20
3- Description du VIH	21
3-1- Structure	21
3-2- Cycle de réplication virale	24
3-2-1- Phase précoce	24
3-2-2- Phase tardive	25
4- Physiopathologie de l'infection à VIH	26
4-1- Cellules cibles	26
4-2- Dynamique de la réplication virale	28
4-3- Evolution de l'infection à VIH	29
5- Thérapeutique anti-VIH	30
5-1- Différents traitements antirétroviraux actuels et à venir	30
5-1-1- Les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INITIs)	30
5-1-2- Les inhibiteurs nucléotidiques de la transcriptase inverse (INtTIs)	32
5-1-3- Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse	33
5-1-4- Les inhibiteurs de la protéase du VIH (IPs)	34
5-1-5- Les inhibiteurs de fusion	36
5-1-6- Les inhibiteurs de l'entrée du VIH	36
5-1-7- Les inhibiteurs de l'intégrase	37
5-1-8- Les molécules en développement clinique	37
5-2- Pharmacologie des traitements antirétroviraux	38
5-1-1- Les inhibiteurs de la transcriptase inverse (INITI, INtTI et INNTI)	38
5-1-2- Les inhibiteurs de la protéase (IPs)	39
5-3- Les polychimiothérapies antirétrovirales	41

CHAPITRE 2 : Echappement thérapeutique	43
1- Observance au traitement antirétroviral	44
2- Résistance aux antirétroviraux	44
2-1- Résistance aux INTIs et INtTIs	45
2-2- Résistance aux INNTIs	45
2-3- Résistance aux IPs	46
2-4- Résistance aux inhibiteurs de fusion	48
3- Les réservoirs viraux	48
3-1- Les réservoirs cellulaires	48
3-2- Les réservoirs anatomiques	51
3-3- Le système nerveux central (SNC) et la barrière hémato-encéphalique (BHE)	52
3-3-1- <i>Historique des recherches</i>	52
3-3-2- <i>Fonction physiologique</i>	53
3-3-3- <i>Un réseau microvasculaire</i>	53
3-3-4- <i>Morphologie des capillaires cérébraux</i>	54
3-3-5- <i>Les complexes jonctionnels</i>	55
3-3-6- <i>Système nerveux central et infection à VIH</i>	57
3-3-7- <i>Problèmes neurologiques associés à l'infection à VIH</i>	60
3-3-8- <i>Passage des antirétroviraux à travers la BHE</i>	61
4- Les transporteurs ABC	63
 CHAPITRE 3 : Les transporteurs ABC	 64
1- Généralités et structures des transporteurs ABC	64
2- La sous-famille MDR : Cas de la P-glycoprotéine	69
2-1- Structure tridimensionnelle de la Pgp	70
2-2- Localisation de la Pgp	70
2-3- Les substrats de la Pgp	71
2-4- Mécanisme d'efflux de la Pgp	72
2-5- Régulation du gène <i>mdr1</i>	73
3- La sous-famille MRP (Multidrug Resistance associated Proteins)	75
3-1- Structure des MRPs	75
3-2- Localisation des MRPs	75
3-3- Fonction des MRPs	78
3-4- Régulation des MRPs	79
4- La sous-famille BCRP (Breast Cancer Resistance Protein)	80
4-1- Structure de la BCRP	80
4-2- Localisation de la BCRP	80
4-3- Fonction de la BCRP	80
4-4- Régulation de la BCRP	81
5- Transporteurs ABC et VIH	81
5-1- Effet de l'infection par le VIH sur l'expression des transporteurs	81

5-2- Effet des transporteurs sur la réplication virale	82
6- Transporteurs ABC et traitements antirétroviraux	83
6-1- Antirétroviraux substrats des transporteurs ABC	83
6-1-1- Substrats de la Pgp	83
6-1-2- Substrats des MRPs	84
6-1-3- Substrats de la BCRP	84
6-2- Effet inhibiteur des antirétroviraux sur les transporteurs ABC	86
6-3- Effet des antirétroviraux sur l'expression et la fonctionnalité des transporteurs ABC	87

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel et méthodes	89
1- Matériel	90
1-1- Produits chimiques, milieux de culture, anticorps	90
1-2- Equipements	91
1-3- Logiciels	92
2- Cellules	92
2-1- Cellules endothéliales cérébrales fœtales humaines (HBMECs)	92
2-2- Cellules mononucléées du sang périphérique (CMSPs)	92
3- Modèle in vitro de barrière hémato-encéphalique humaine	93
3-1- Obtention du tissu cérébral	93
3-2- Isolement et culture des cellules endothéliales cérébrales et des cellules gliales	93
3-3- Caractérisation des cellules	93
3-3-1- Immunophénotypage en microscopie à fluorescence	93
3-3-2- Immunomarquage en cytométrie de flux	94
3-4- Genèse du modèle in vitro de BHE	96
3-5- Paramètres de validation du modèle	96
3-5-1- Présence des jonctions serrées	97
3-5-2- Intégrité de la barrière	97
3-5-3- Protéines d'efflux	98
4- Interaction des antirétroviraux avec les cellules	99
4-1- Traitement des cellules	99
4-1-1- Les cellules mononucléées du sang périphérique (CMSPs)	99
4-1-2- Les cellules endothéliales cérébrales fœtales humaines (HBMECs)	100
4-2- Influence des antirétroviraux sur la régulation des transporteurs d'efflux in vitro	100
4-2-1- Etude de l'expression des ARN messagers des transporteurs	100
4-2-2- Etude de l'expression protéique des transporteurs	101
4-2-3- Etude de la fonctionnalité des transporteurs	101
4-2-4- Analyse en cytométrie de flux	102
4-3- Influence des transporteurs d'efflux sur l'accumulation intracellulaire des antirétroviraux <i>in vitro</i>	105
4-3-1- Préparation des solutions stocks et diluées	105

4-3-2- Méthodologie analytique pour le dosage de FTC, TFV, EFV	106
4-3-3- Méthodologie analytique pour le dosage des IPs	107
4-3-4- Préparation des échantillons (standards, contrôles qualité, échantillons)	109
4-3-5- Comptage cellulaire	110
4-4- Accumulation d'un substrat radioactif, la [3H]-vincristine	110
5- Analyse statistique	110

RESULTATS

Chapitre 1 : Emtricitabine, Interaction avec les transporteurs d'efflux et conséquences sur l'accumulation des IPs dans les CMSPs	112
1- Introduction	112
ARTICLE 1	114
2- Résultats complémentaires sur l'expression des ARNm de la Pgp et de la MRP1	125
3- Discussion	127
Chapitre 2 : Association Tenofovir – Emtricitabine – Efavirenz, Régulation in vitro des MRPs, Conséquences sur leur concentration intracellulaire	130
1- Introduction	130
ARTICLE 2	132
2- Résultats complémentaires	142
2-1- Expression protéique des transporteurs Pgp et MRP1	142
2-2- Effet dose sur les concentrations de médicaments en association	142
3- Discussion	146
Chapitre 3 : Effet de l'atazanavir sur les transporteurs ABC aux niveaux central et périphérique, Passage de l'atazanavir à travers un modèle in vitro de BHE	150
1- Introduction	150
ARTICLE 3	152
2- Résultats complémentaires sur l'expression en ARNm des transporteurs ABC	162
3- Discussion	163
DISCUSSION GENERALE	166
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	176
ANNEXES	219

Abréviations

ABC	Abacavir
ABC	« ATP Binding Cassette »
ADC	Complexe de démence associé au SIDA
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFSSAPS	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
ANOVA	Analyse de variance
ANRS	Agence Nationale de recherche sur le SIDA
APV	Amprénavir
ARN	Acide ribonucléique
ARV	Antirétroviraux
ATP	Adénosine triphosphate
ATV	Atazanavir
AUC	Aire sous la courbe
AZT	Zidovudine
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
BSA	Bovine Serum Albumin
2CADO	2-Chloroadénosine
CAR	« Constitutive Androstane receptor »
CCR5	« Chemokine CC motif receptor 5 »
CD	« Cluster of differentiation »
CEM	Cellules épithéliales mammaires
Cmax	Concentration maximale
CMSP	Cellule mononucléée du sang périphérique
Cres	Concentration résiduelle
CV	Charge virale
CXCR4	« Chemokine CXC motif receptor 4 »
CYP	Cytochrome P450
DAPI	4',6-diamidine-2-phénylindole
ddC	Zalcitabine
ddl	Didanosine
d4T	Stavudine
DMSO	DiMethyl Sulfoxyde
EFV	Efavirenz
ESI	Source d'ionisation electrospray
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
FSC	« Forward scatter »
FTC	Emtricitabine
FXR	« Farnesoid X-activated Receptor »

GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GFAP	« Glial Fibrillary Acidic Protein »
GSH	Glutathion réduit
GTP	Guanosine triphosphate
HAART	Thérapeutique antirétrovirale hautement active
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase
HTLV	« Human T cell Leukemia / lymphoma Virus »
IDV	Indinavir
IgG	Immunoglobuline G
INNTI	Inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse
INTI	Inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse
INtTI	Inhibiteur nucléotidique de la transcriptase inverse
IP	Inhibiteur de la protéase du VIH-1
JAM	Molécule jonctionnelle d'adhésion
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LPV	Lopinavir
LTC₄	Leucotriène C ₄
LTR	« Long terminal repeat »
MCT	« Monocarboxylate transporter »
MDR	« Multidrug resistance »
MIP	« Macrophage inflammatory protein »
MRP	« Multidrug Resistance-associated Protein »
NBD	Domaine de fixation au nucléotide
NBMPR	Nitrobenzylthioinosine
NFV	Nelfinavir
NVP	Névirapine
PHA	Phyto-hémagglutinine
PBS	Phosphate Buffer Saline
PE	Phycoérythrine
PIC	Complexe de pré-intégration
Pgp	P-glycoprotéine
PXR	« Pregnane X Receptor »
RANTES	« Regulated, on activation, normal T cell expressed and secreted »
RRE	« Rev responsive element »
RTV	Ritonavir
SEM	Ecart-type de la distribution des moyennes
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SLC	« Solute Carrier »
SNC	Système nerveux central
SSC	« Side scatter »
SQV	Saquinavir
SVF	Sérum de veau fœtal
SXR	Steroid and Xenobiotic Receptor
TAM	« Thymidine analog mutation »
TAR	« Trans-activating response element »

3TC	Lamivudine
TDF	Ténofovir disoproxil fumarate
TFV	Ténofovir
TI	Transcriptase inverse
TPV	Tipranavir
TMD	Domaine transmembranaire
UV	Ultra-violet
VIH	Virus de l'immunodéficience humain
ZO	Zonula Occludens

Liste des illustrations

Avant-propos

Figure 1 : Graphe représentant le pourcentage de personnes vivant avec le SIDA (en ordonnée) en fonction du produit national brut du pays (en abscisse).

Introduction générale

- Figure 2 :** Schéma récapitulatif des personnes vivant avec le VIH (Estimations de décembre 2007, ONUSIDA)
- Figure 3 :** A- Schéma de la morphologie de la particule virale du VIH-1 ; B- Représentations par microscopie électronique de particules virales matures, de la capside virale
- Figure 4 :** Organisation génomique du VIH-1
- Figure 5 :** Schéma des étapes de fixation et de fusion du virus et de la cellule hôte
- Figure 6 :** Schéma des principales étapes du cycle biologique du VIH-1
- Figure 7 :** Dynamique de l'infection in vivo
- Figure 8 :** Evolution des paramètres virologique et immunologique au cours de l'infection à VIH
- Figure 9 :** Structures chimiques d'inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse
- Figure 10 :** Structure chimique d'un inhibiteur nucléotidique de la transcriptase inverse
- Figure 11 :** Structures chimiques d'inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse
- Figure 12 :** Structures chimiques d'inhibiteurs de la protéase du VIH
- Figure 13 :** Structure cristallographique de la transcriptase inverse du VIH-1 complexée à une molécule d'ADN double brin et un dTTP
- Figure 13 :** Structure cristallographique de la protéase du VIH-1 complexée à un inhibiteur
- Figure 14 :** L'état d'activation des lymphocytes T influence l'état de latence du VIH (latence pré- ou post-intégrative)
- Figure 15 :** L'état d'activation des lymphocytes T influence l'état de latence du VIH (latence pré- ou post-intégrative)
- Figure 16 :** Temps de demi-vie des différents réservoirs cellulaires (jours)
- Figure 17 :** Historique des recherches sur la barrière hémato-encéphalique
- Figure 18 :** Microvaisseaux cérébraux
- Figure 19 :** Morphologie des capillaires cérébraux
- Figure 20 :** Les complexes jonctionnels au niveau de la barrière hémato-encéphalique : jonctions serrées et jonctions adhérentes
- Figure 21 :** Mécanisme d'invasion du SNC par le VIH
- Figure 22 :** Immunopathogénèse de l'encéphalopathie à VIH
- Figure 23 :** Représentation schématique de l'organisation structurale transmembranaire des transporteurs ABC
- Figure 24 :** Structure tridimensionnelle à basse résolution (25 Å) de la Pgp
- Figure 25 :** Mécanismes d'efflux de la Pgp

Figure 26 : Localisation des transporteurs d'influx et d'efflux sur les hépatocytes

Figure 27 : Localisation des transporteurs d'influx et d'efflux sur les entérocytes

Figure 28 : Localisation des transporteurs d'influx et d'efflux au niveau de la barrière hémato-encéphalique

Figure 29 : Localisation des transporteurs d'influx et d'efflux dans les cellules épithéliales rénales

Figure 30 : Localisation des transporteurs d'influx et d'efflux dans les cellules mononucléées du sang périphérique

Matériel et Méthodes

Figure 31 : A- Immunomarquage de cellules endothéliales cérébrales humaines marquées avec un anticorps anti-CD31 ; B- Immunomarquage de cellules gliales marquées avec un anticorps anti-GFAP et marquage des noyaux au DAPI

Figure 32 : Histogrammes représentant l'intensité de fluorescence des cellules en fonction du nombre d'événements : A- Cellules marquées avec l'anticorps CD31:PE. Ici, plus de 96% des cellules expriment le marqueur CD31 ; B- L'histogramme du haut représente les cellules témoin (contrôle isotypique, IgG:FITC), l'histogramme du bas sont les cellules marquées avec l'anticorps anti-GFAP :FITC.

Figure 33 : Schéma représentant le modèle *in vitro* de BHE

Figure 34 : Immunomarquage des protéines des jonctions serrées en microscopie confocale : A- *Zonula Occludens* ; B- Claudine-5

Figure 35 : Cinétique de passage du [¹⁴C]-sucrose

Figure 36 : Efflux de la [³H]-digoxine au niveau du modèle de BHE *in vitro*

Figure 37 : Mise en évidence des différents types cellulaires présents dans les CMSPs

Figure 38 : Expression de la P-glycoprotéine dans les lymphocytes totaux

Figure 39 : Fonctionnalité de la P-glycoprotéine dans les lymphocytes totaux

Figure 40 : Chromatogramme d'une solution standard de tenofovir, emtricitabine et 2CADO (étalon interne)

Figure 41 : Chromatogramme d'une solution standard d'efavirenz et 2-CADO (étalon interne)

Figure 42 : Chromatogramme d'une solution standard de ritonavir, d'atazanavir, de lopinavir et de kétoconazole (étalon interne)

Résultats

Figure 43 : Etude de l'expression de la Pgp et de la MRP1 dans les CMSPs non traités par RT-PCR en temps réel

Figure 44 : Effet des différents traitements (FTC, TFV, EFV, FTC+TFV, TFV+EFV, FTC+TFV+EFV) sur l'expression des transporteurs dans les lymphocytes

Figure 45 : Concentration intracellulaire de FTC dosé en LC-MS/MS, en association avec le TFV [à différentes concentrations (1, 5 et 25 µM)]

Figure 46 : Concentration intracellulaire de TFV dosé en LC-MS/MS, en association avec le FTC [à différentes concentrations (1, 5 et 25 µM)]

Figure 47 : Concentration intracellulaire de FTC dosé en LC-MS/MS, en association avec le TFV et l'EFV [à différentes concentrations (1, 5 et 25 µM)]

Figure 48 : Concentration intracellulaire de TFV dosé en LC-MS/MS, en association avec le FTC et l'EFV [à différentes concentrations (1, 5 et 25 µM)]

Figure 49 : Concentration intracellulaire de TFV dosé en LC-MS/MS, en association avec l'EFV [à différentes concentrations (1, 5 et 25 μ M)]

Figure 50 : Etude de l'expression des transporteurs d'efflux dans les CMSPs (en orange), les cellules endothéliales cérébrales humaines fœtales (en rose), les capillaires endothéliaux humains adultes (en vert), par RT-PCR en temps réel

Discussion générale

Figure 51 : Schéma générique du métabolisme des INTIs

Figure 52 : Rôle physiologique hypothétique du système de transport d'efflux de la BHE

Liste des tableaux

Introduction générale

- Tableau 1 :** Tableau récapitulatif des fonctions des protéines virales
- Tableau 2 :** Principaux paramètres pharmacocinétiques des inhibiteurs de la transcriptase inverse
- Tableau 3 :** Principaux paramètres pharmacocinétiques des inhibiteurs de la protéase
- Tableau 4 :** Exemples d'associations recommandées pour un premier traitement antirétroviral
- Tableau 5 :** Liste des gènes ABC humains, localisation chromosomique et fonction
- Tableau 6 :** Les substrats de la Pgp
- Tableau 7 :** Les substrats des MRPs
- Tableau 8 :** Récapitulatif non exhaustif des antirétroviraux substrats des transporteurs ABC
- Tableau 9 :** Tableau récapitulatif de l'effet des antirétroviraux sur l'efflux médié par les transporteurs ABC
- Tableau 10 :** Tableau récapitulatif de l'effet des antirétroviraux sur l'expression et la fonctionnalité des transporteurs ABC

Matériel et Méthodes

- Tableau 11 :** Liste des produits chimiques, anticorps, milieux de culture, tampons utilisés, ainsi que leur provenance (Fournisseur, ville, pays)
- Tableau 12 :** Liste des équipements utilisés, ainsi que leur provenance (Fournisseur, ville, pays)
- Tableau 13 :** Liste des logiciels utilisés, ainsi que leur provenance (Fournisseur, ville, pays)
- Tableau 14 :** Paramètres d'optimisation du spectromètre de masse (dosage des NRTIs et NNRTIs)
- Tableau 15 :** Gradient d'élution pour la quantification des IPs par LC-MS/MS
- Tableau 16 :** Paramètres d'optimisation du spectromètre de masse (dosage des IPs)

Résultats

- Tableau 16 :** Activité des transporteurs (Accumulation de calcéine-AM en présence d'inhibiteurs spécifiques)
- Tableau 17 :** Concentrations intracellulaires d'ARV. Les CMSPs sont incubées pendant 72 h avec FTC 5 μ M, LPV/RTV 5/1 μ M, ATV/RTV 5/1 μ M, FTC/LPV/RTV 5/5/1 μ M ou FTC/ATV/RTV 5/5/1 μ M

Le SIDA, Syndrome de l'ImmunoDéficiency Acquis, est une maladie infectieuse causée par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), entraînant l'effondrement du système immunitaire.

Depuis l'année 2002, le SIDA est considéré comme une pandémie globale.

Les dernières estimations fournies par le rapport ONUSIDA 2007 portent à 33,2 millions, le nombre de personnes séropositives dans le monde ; 2,5 millions, le nombre de personnes nouvellement séropositives en 2007 ; et 2,1 millions, le nombre de personnes mortes du SIDA en 2007. Ce qui permet d'estimer à plus de 25 millions le nombre de morts depuis le début de la maladie en 1981. L'organisation mondiale note une stabilisation du taux d'infection (c'est-à-dire du nombre de personnes infectées par rapport à la population globale), ce qui amène à penser que le pic de l'épidémie est atteint et que celle-ci se stabilise (Peter Piot, *Libération* n°7794, 31 mai 2006). Cependant, le nombre de personnes infectées a augmenté, en raison de l'augmentation de la population et de l'accès aux trithérapies (qui retarde les décès).

Dans de nombreuses régions du monde, les nouvelles infections à VIH sont largement concentrées parmi les jeunes (15-24 ans). Parmi les adultes de 15 ans et plus, les jeunes ont représenté 40% des nouvelles infections en 2006.

La dynamique de l'épidémie se rapporte aux voies de transmission du VIH (sexuelle, sanguine et materno-fœtale) et aux comportements des populations concernées vis-à-vis des pratiques à risque de contamination. Elle diffère selon les régions en fonction de facteurs culturels, socio-politiques, économiques, démographiques, religieux, selon les possibilités d'accès aux soins d'une population, la célérité de mise en place de programmes de prévention.

Dans les pays ayant accès aux traitements antirétroviraux, la prise en charge de l'infection par le VIH est désormais celle d'une maladie au long court. Les trithérapies antirétrovirales ont considérablement réduit la mortalité et la morbidité de l'infection. En contrepartie ont émergé d'autres problématiques liées aux complications des traitements eux-mêmes (lipodystrophie, accroissement du risque cardiovasculaire, troubles glucido-lipidiques, pathologie mitochondriale), ou des problèmes d'échec immuno-virologique, liés entre autre, à la question de l'observance.

Cette situation privilégiée d'accès aux traitements ne concerne que les pays riches qui peuvent assurer la prise en charge financière de ces thérapeutiques. Cependant, le nombre de personnes recevant un traitement antirétroviral contre le VIH/SIDA dans les pays en développement a considérablement augmenté puisqu'il a plus que doublé, passant de 400 000 personnes en décembre 2003 à environ un million en juin 2005.

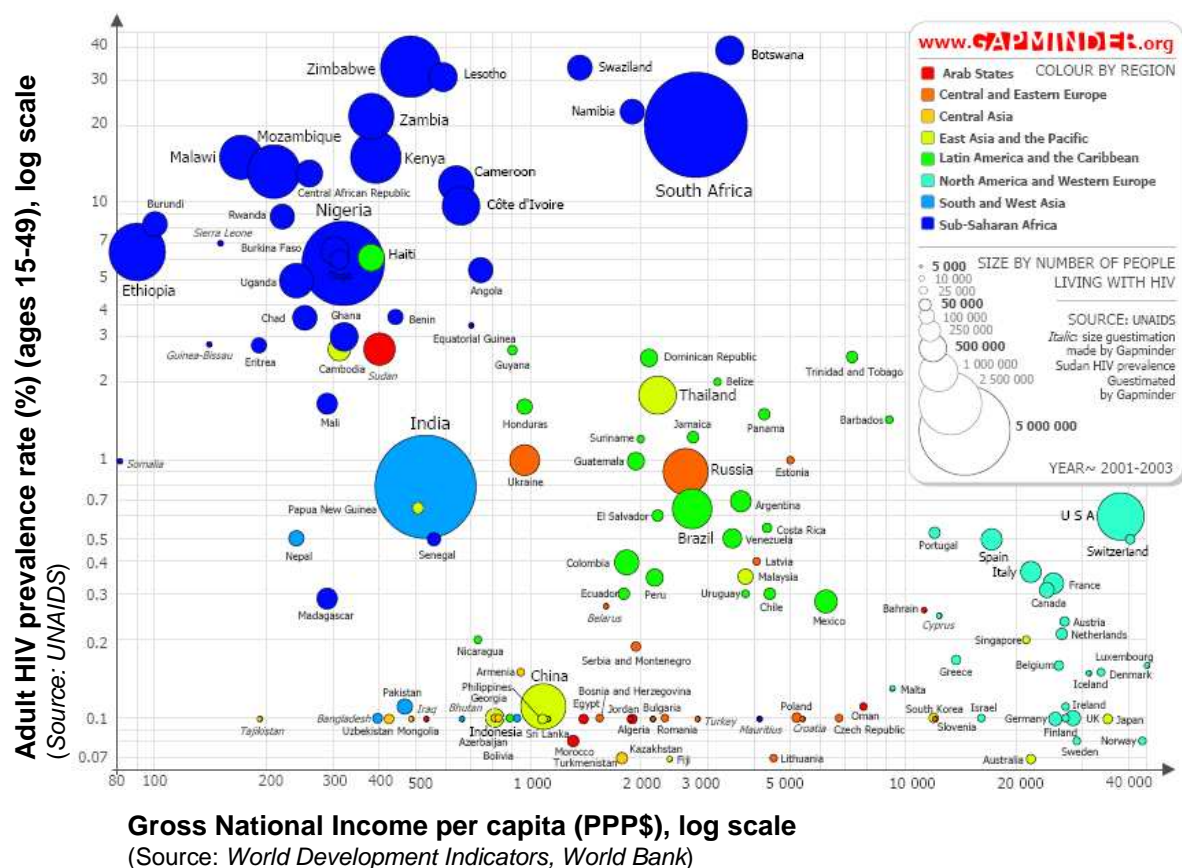


Figure 1 : Graphe représentant le pourcentage de personnes vivant avec le SIDA (en ordonnée) en fonction du produit national brut du pays (en abscisse). Source : Gapminder

OBJECTIFS GÉNÉRAUX

L'échappement thérapeutique aux antirétroviraux constitue l'obstacle majeur au traitement des patients infectés par le VIH. Si l'implication des mutations virales dans la survenue de ces échecs virologiques et/ou immunologiques est démontrée, celle des facteurs cellulaires de l'hôte reste controversée. Parmi ces facteurs, et par analogie avec la résistance aux anticancéreux, les transporteurs ABC tels que la P-glycoprotéine (Pgp), les protéines de résistance multi-drogues (MRPs), la protéine de résistance multi-drogues du cancer du sein (BCRP), ont été désignés comme acteurs potentiels. De nombreux arguments laissent en effet penser que la Pgp, les MRPs, la BCRP sont à la fois des acteurs et des cibles thérapeutiques, pouvant limiter ou améliorer l'efficacité des multi-thérapies antirétrovirales.

Les protéines membranaires jouent un rôle clé dans les phénomènes généraux de la pharmacocinétique et de la pharmacologie clinique de nombreux médicaments et en particulier des antirétroviraux (ARV). Ces phénomènes sont principalement l'absorption digestive (barrière intestinale), la distribution tissulaire (barrière hémato-encéphalique, barrière hémato-testiculaire...), le métabolisme (en particulier hépatique), et l'excrétion (biliaire ou urinaire). Ils impliquent les cytochromes P450, dits enzymes de détoxification de phase I, et les transporteurs ABC, dits enzymes de détoxification de phase III.

Parmi ces protéines, les transporteurs d'efflux, la Pgp, les MRPs et la BCRP, semblent jouer un rôle prépondérant dans la régulation des concentrations intracellulaires des composés antirétroviraux au niveau des sites de réplication du VIH-1. L'efflux actif des inhibiteurs de la protéase (IPs) et des inhibiteurs nucléosidiques (INTIs) ou nucléotidiques (INTtIs) de la transcriptase inverse pourrait conduire à des concentrations sub-inhibitrices de ces composés et favoriser l'émergence de souches virales résistantes (Strain *et al.*, 2005).

Ainsi la compréhension des régulations génique et fonctionnelle de ces transporteurs dans le cadre de multi-thérapies antirétrovirales pourrait aider à une optimisation de la biodisponibilité tissulaire des ARV. Les protéines d'efflux sont exprimées à la surface des cellules CD4+ cibles du VIH et de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et jouent un rôle dans la limitation de la perméabilité locale. Cependant, les mécanismes de régulation de l'expression de ces gènes ne sont que partiellement compris.

De plus, les données de la littérature et les premières études du laboratoire semblent montrer que les combinaisons thérapeutiques incluant le ritonavir (RTV) ou des INTIs et/ou des INTtIs, pourraient influencer l'expression et la fonctionnalité des protéines d'efflux (Pgp, MRP1 et BCRP) dans les cellules mononucléées du sang périphérique (CMSPs) et au niveau de la BHE, modifiant ainsi l'accumulation intracellulaire ou cérébrale des IPs (atazanavir (ATZ), lopinavir (LPV), indinavir (IDV), nelfinavir (NFV)) et de l'éfavirenz (EFV) (Khoo *et al.*, 2002 ; Ford *et al.*, 2004 ; Meaden *et al.*, 2002).

Afin d'apporter des éléments de réponse à ces différentes questions, ce travail de thèse s'est articulé autour des axes suivants :

1. Définir le caractère substrat et/ou inhibiteur de deux molécules clés des thérapies antirétrovirales actuelles : l'emtricitabine (FTC) et l'atazanavir (ATV), vis-à-vis des transporteurs Pgp, MRPs et BCRP, aux niveaux des cellules CD4+ et de la BHE
2. Etudier l'impact des multi-thérapies anti-VIH sur l'expression et la fonctionnalité de ces transporteurs
3. Définir l'impact de cette régulation sur l'accumulation intracellulaire des médicaments associés

Dans un schéma classique de prise en charge médicamenteuse, les cliniciens utilisent deux inhibiteurs nucléosidiques ou nucléotidiques de la transcriptase inverse, en association avec un inhibiteur de la protéase boosté par de faibles doses de ritonavir ou un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse. Nous avons choisi de nous focaliser sur l'emtricitabine (FTC), nouveau médicament administré en une prise quotidienne, qui présente une grande efficacité antirétrovirale et de nombreux autres avantages. Nous avons étudié plus particulièrement les multi-thérapies associant cette molécule, soit à des inhibiteurs de la protéase couramment utilisés (lopinavir/ritonavir ou atazanavir/ritonavir), soit au ténofovir et à l'efavirenz (composant ainsi le nouveau médicament ATRIPLA®).

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

Chapitre 1

Le virus de l'immunodéficience humaine

1- Epidémiologie de l'infection à VIH

1-1- Analyse phylogénétique

Deux virus distincts de l'immunodéficience humaine ont été reconnus : il s'agit des VIH-1 et VIH-2.

La plus ancienne souche VIH-1 retrouvée proviendrait d'un homme zaïrois, d'ethnie bantoue, décédé en 1959. L'analyse génétique de ce virus, proche des sous-types D et F, placerait l'apparition de l'ancêtre VIH-1 dans les années 1930 (Korber *et al.*, 2000).

La variabilité du virus et les possibilités de recombinaisons génétiques entre les différentes souches, font apparaître à l'heure actuelle de grandes divergences parmi les divers isolats du VIH-1. On distingue ainsi, pour le VIH-1, trois groupes : M (*Major*) composé de 11 sous-types représentés par les lettres A à K (Louwagie *et al.*, 1993 ; Myers, 1994) ; O (*Outlier*) composé de 7 sous-types de A à G, et N de répartition très restreinte au Cameroun (Simon *et al.*, 1998), comportant de grandes similitudes avec le virus d'immunodéficience simienne (SIV) des chimpanzés de ce pays. Chaque sous-type rassemble des souches ayant plus de 80% d'homologie génétique entre elles.

Les sous-types VIH-1 se répartissent de manière hétérogène selon les régions touchées et l'ancienneté de l'épidémie. Ainsi le sous-type B sévit principalement en Europe, en Amérique du nord, au Japon et en Australie, avec pour ces pays une tendance à la diversification due à l'introduction de nouvelles souches virales (Selik *et al.*, 1984 ; Brodine *et al.*, 1995 ; Buonaguro *et al.*, 2007).

En Afrique sub-saharienne, berceau du VIH-1, tous les sous-types sont présents. En Asie, l'épidémie indienne est due au sous-type C, en Thaïlande sévissent les sous-types B et E (Weniger *et al.*, 1994).

1-2- L'épidémie à l'échelle mondiale

C'est le VIH-1, groupe M qui est responsable de la pandémie actuelle, le groupe O n'a pas diffusé au-delà de l'Afrique centrale, le Cameroun en est l'épicentre. Le VIH-2 subsiste en Afrique de l'ouest sur un mode endémique.

Deux vagues de diffusion du VIH-1 se sont succédées. Dans les années 1970 - 80, l'épidémie s'est propagée en Afrique sub-saharienne et dans les pays industrialisés (Europe, Amérique du nord, Australie, Japon). Après 1980, le terme de pandémie est utilisé, avec tout d'abord une diffusion

explosive en Asie du sud et du sud-est (Indes, Thaïlande) puis plus tard en Ukraine, Russie et actuellement en Chine.

Selon le rapport ONUSIDA de décembre 2006, l'Afrique subsaharienne supporte toujours la plus grande partie de l'épidémie mondiale. Deux tiers (63%) de tous les adultes et enfants vivant avec le VIH dans le monde se trouvent en Afrique subsaharienne, et l'épicentre de l'épidémie se situe en Afrique australe. Un tiers (32%) de toutes les personnes vivant avec le VIH dans le monde se trouvent en Afrique australe et 34% de tous les décès dus au SIDA en 2006 s'y sont produits.

Le nombre de personnes vivant avec le VIH a augmenté dans chacune des régions du monde au cours des deux dernières années. Les augmentations les plus frappantes ont eu lieu en Asie de l'Est et en Europe orientale et Asie centrale, où le nombre de personnes vivant avec le VIH en 2006 était supérieur d'un cinquième (21%) à celui de 2004. Les 270 000 adultes et enfants nouvellement infectés par le VIH en Europe orientale et Asie centrale en 2006 constituent une augmentation de près de 70% par rapport aux 160 000 personnes qui avaient contracté le VIH en 2004. En Asie du Sud et du Sud-Est, le nombre de nouvelles infections à VIH a augmenté de 15% en 2004-2006, alors qu'au Moyen-Orient et en Afrique du Nord il a augmenté de 12%. En Amérique latine, aux Caraïbes, et en Amérique du Nord, les nouvelles infections en 2006 sont restées approximativement les mêmes qu'en 2004.

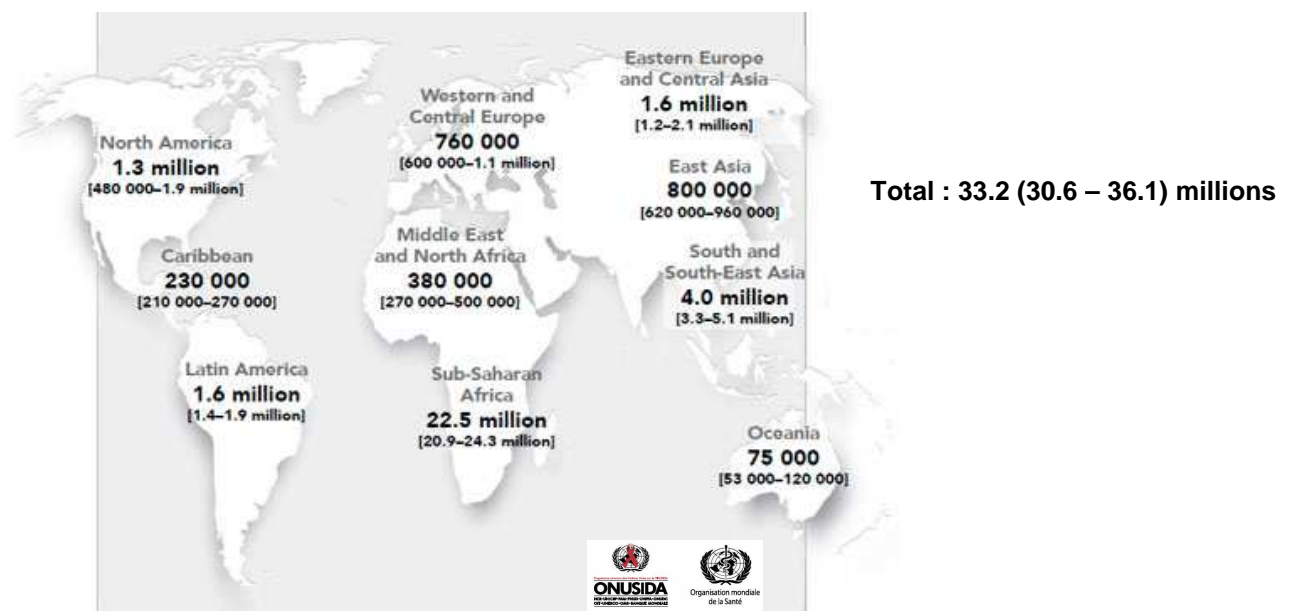


Figure 2 : Schéma récapitulatif des personnes vivant avec le VIH (Estimations de décembre 2007, ONUSIDA)

2- Historique des découvertes

Les observatoires épidémiologiques américains (Centers for Disease Control, centralisés à Atlanta) constatèrent en juin 1981 une augmentation inexpliquée de la fréquence des cas de pneumocystoses pulmonaires et de sarcomes de Kaposi : il s'agissait des premières manifestations cliniques de l'épidémie du SIDA.

Fin 1981, les premières études montrent que cette affection jusque là inconnue, se transmet par voie sexuelle et sanguine et qu'elle ne frappe pas que les homosexuels. Les Américains décident d'appeler cette affection AIDS pour Acquired Immuno Deficiency Syndrome, que les Français vont traduire par SIDA (Syndrome d'Immuno-Déficience Acquise) (Masur et *al.*, 1981 ; Siegal et *al.*, 1981).

Le VIH-1 a été identifié en mai 1983 à l'Institut Pasteur (Barre-Sinoussi et *al.*, 1983), puis aux Etats Unis (Gallo et *al.*, 1983).

En 1986, la communauté scientifique adopte le nom de HIV (Human Immunodeficiency Virus) ou VIH (Virus de l'immunodéficience humaine).

Cette même année, le Pr Montagnier et son équipe de l'Institut Pasteur isolent un deuxième virus, le VIH-2, en collaboration avec les chercheurs et médecins de l'Hôpital Claude Bernard de Paris et l'Hôpital Ega Moniz de Lisbonne. Le malade est originaire de Guinée-Bissau (Clavel et *al.*, 1986).

En 1987, l'AZT, nouvel antiviral venu des Etats Unis, inhibiteur de la transcriptase inverse, est commercialisé. L'AZT apporte une amélioration clinique des patients mais restant limitée dans le temps.

Entre 1992 et 1994, de nouveaux inhibiteurs de la transcriptase inverse (INTIs) apparaissent : ddC et ddI. Ils apportent une amélioration aux patients déjà sous AZT et en échec thérapeutique.

En 1994-1995, c'est le début des bithérapies (ddI + AZT ou ddC + AZT). Elles se révèlent plus efficaces que les monothérapies (plus puissantes en termes de diminution de la charge virale).

En 1995-1996, les inhibiteurs de protéase sont lancés sur le marché. Associés en trithérapie avec des INTIs, ils améliorent considérablement l'efficacité des traitements : chute de la charge virale, augmentation des lymphocytes CD4, diminution importante de la mortalité.

En 1997 apparaissent les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTIs).

En 2003, une nouvelle classe d'antirétroviraux fait son apparition, ce sont les inhibiteurs de fusion. Et en 2007, ce sont les inhibiteurs du corécepteur CCR5 (maraviroc) et les inhibiteurs de l'intégrase (raltegravir).

3- Description du VIH

Le VIH est l'agent responsable du SIDA. Le VIH est un virus à ARN (rétrovirus ou *Retroviridae*). Le clonage et le séquençage de l'ADN proviral du VIH, purifié à partir de lymphocytes T infectés, ont permis de classer ce virus parmi les lentivirus (*lentiviridae*) (Ratner *et al.*, 1985 ; Wain-Hobson *et al.*, 1985). Deux sérotypes ont été identifiés à ce jour, le VIH-1 présent dans tous les pays et le VIH-2 cantonné principalement à l'Afrique de l'Ouest.

Les rétrovirus sont caractérisés par la capacité, quand ils infectent une cellule, de transcrire leur molécule d'ARN (génome du virus) en une molécule d'ADN virale qui est intégrée à l'ADN de la cellule infectée grâce à une enzyme (transcriptase inverse).

Deux autres caractéristiques du VIH sont communes aux lentivirus.

L'une de ces caractéristiques est la latence : l'ADN viral s'intègre par l'une de ses extrémités (Long Terminal Repeat, LTR) dans l'ADN de la cellule infectée. Ce provirus se comporte alors comme un des gènes de la cellule infectée :

- Il peut rester silencieux, il est alors transmis aux cellules descendantes à chaque mitose ; mais les gènes du VIH sont temporairement endormis, lui conférant une invisibilité antigénique. L'utilisation de la mesure de la charge virale a pu cependant montrer qu'un degré variable de multiplication virale existait déjà au cours de cette période, et, donc, il s'agit plus d'une latence clinique que biologique.
- Il peut également s'exprimer : l'information génétique est alors transmise en ARN messager, puis en protéines virales.

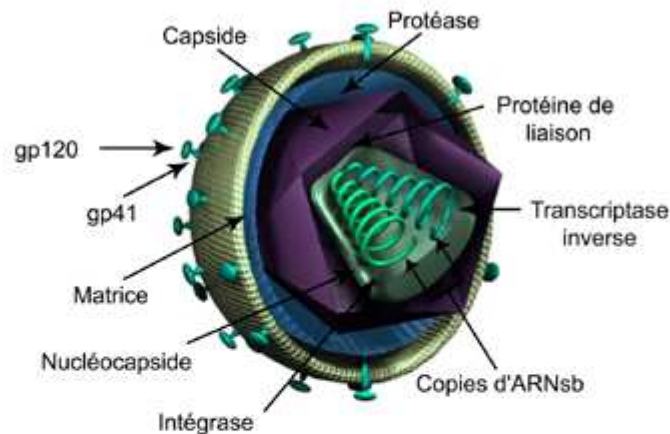
L'autre caractéristique commune aux lentivirus est la variabilité génétique : elle existe d'un patient à un autre, mais aussi chez un même patient, à des époques différentes. La séquence la plus variable analysée correspond au gène de l'enveloppe *env* et plus particulièrement à 5 régions hypervariables (V_1 à V_5) distribuées parmi 5 régions conservées (C_1 à C_5) (Starcich *et al.*, 1986 ; Willey *et al.*, 1986). Les gènes transactivateurs *tat* et *rev* ont une variabilité intermédiaire. Cette variabilité explique la possibilité d'apparition de résistances à certains traitements qui seraient moins fréquentes dans le cadre de polythérapie, puisque les chances que le VIH trouve la combinaison de mutation seraient moindres. La recherche d'une réponse contre les parties constantes de la structure génétique du VIH constitue la base des travaux de recherche pour la mise au point d'un vaccin.

3-1- Structure

Le VIH se présente sous forme de particules sphériques d'un diamètre de 90 à 120 nm. Il comporte une enveloppe virale constituée d'une bicouche lipidique et de deux glycoprotéines : gp120 (SU) et

gp41 (TM). La molécule gp41 traverse la bicouche lipidique tandis que la molécule gp120 occupe une position plus périphérique. La gp120 joue le rôle de récepteur viral de la molécule membranaire CD4 des cellules hôte. La gp41 est responsable de la fusion de l'enveloppe avec la membrane cellulaire. Ces deux glycoprotéines sont liées entre elles par des liaisons non covalentes (Doms et *al.*, 1991). L'enveloppe virale dérive de la cellule hôte, elle contient donc quelques protéines membranaires de cette dernière, y compris des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (Henderson et *al.*, 1987 ; Schols et *al.*, 1992). A l'intérieur, le core viral ou nucléocapside inclut une couche de protéines de matrice p17 et une couche plus profonde de protéines de capsid p24. p17 est une protéine myristilée renfermant la protéase virale. La polymérisation de p24 conduit à la formation d'un cône tronqué renfermant le génome viral (Barré-Sinoussi, 1996). Ce génome est constitué de deux copies d'ARN simple brin associées à deux molécules de transcriptase inverse (p64) et à d'autres protéines enzymatiques (protéase p10 et intégrase p32).

A



B

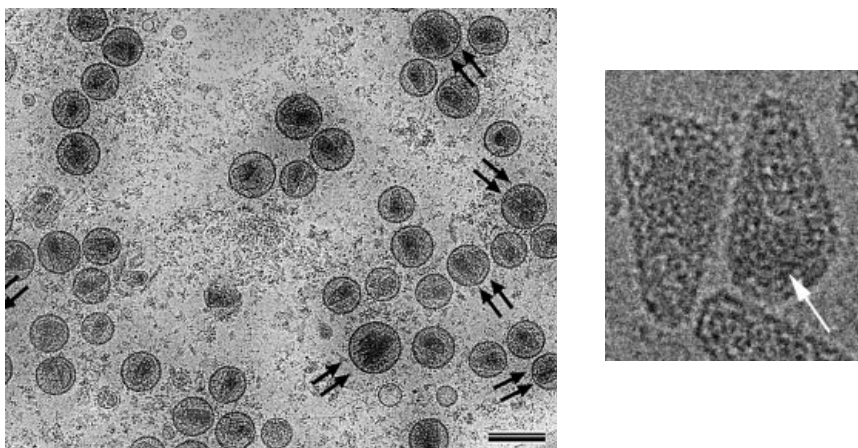


Figure 3 : A- Schéma de la morphologie de la particule virale du VIH-1

B- Représentations par microscopie électronique de particules virales matures, de la capsid virale (Briggs et *al.*, 2003)

Le génome du VIH est constitué uniquement de deux molécules d'ARN monocaténares de 9,2 kb et de polarité positive, disposant à chaque extrémité d'une région R identique, indispensable à la transcription inverse. Les ARN génomiques viraux ont une structure d'ARNm : ils possèdent une coiffe en 5' et sont polyadénylés en 3'.

Le VIH possède 3 gènes rétroviraux codant pour différentes protéines virales. Le gène *gag* (groupe antigène) code pour des protéines internes ("core") : p50 et p40 qui se cliveront en p13, p18 et p24. Le gène *pol* (polymérase) code pour des enzymes nécessaires à sa réplication : notamment p68 (transcriptase inverse) et p34 (intégrase). Le gène *env* (enveloppe) code pour des glycoprotéines (gp 120 et gp 41 issues de gp 160).

Contrairement aux autres rétrovirus, le VIH possède d'autres gènes intervenant dans sa réplication. Il existe des gènes régulateurs : *tat* qui favorise l'augmentation du niveau de la synthèse des protéines virales, *rev* qui favorise l'augmentation des ARN messagers correspondant aux protéines de *gag*, *pol* et *env* ; ainsi que d'autres gènes tels que *vif* qui permet d'augmenter l'infectiosité, *nef*, *vpu* ou *vpr* (*vpx* pour le VIH-2) (Ratner *et al.*, 1985).

Gène	Protéine produite	Fonction de la protéine
gag : code pour les protéines de la nucléocapside	p17	forme la couche protéique externe du core
	p24	forme la couche protéique interne du core
	p9	est un composant du core
	p7	se lie directement au RNA génomique
env : code pour les glycoprotéines de l'enveloppe	gp41	est une protéine membranaires associée à gp 120 et nécessaire à la fusion
	gp 120	fait saillie au niveau de l'enveloppe et se lie au CD4
pol : code pour des enzymes	p64	a une activité de transcriptase inverse et une activité de RNase
	p51	a une activité de transcriptase inverse
	p10	est une protéase qui clive le précurseur des protéines codées par le gène gag
	p32	est une intégrase
vif	p23	est à l'origine du pouvoir infectieux de la particule virale
vpr	p15	active faiblement la transcription de l'ADN proviral
tat	p14	active fortement la transcription de l'ADN proviral
rev	p19	permet l'exportation des ARNm du noyau
nef	p27	augmente la réplication virale ; diminue le nombre de cellules hôte
vpu	p16	est nécessaire à un assemblage viral efficace et au bourgeonnement

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des fonctions des protéines virales



(www.stanford.edu)

3-2- Cycle de réplication virale

Tout comme les autres virus, le VIH ne peut se répliquer qu'en pénétrant dans une cellule et en utilisant sa machinerie cellulaire. Le cycle de réplication du VIH se divise en deux phases : une précoce et une tardive (Freed, 2001).

3-2-1- Phase précoce

Lors de la phase précoce, le virus se fixe sur la cellule cible par reconnaissance entre la protéine virale gp120 et la protéine CD4 du lymphocyte T ou d'autres cellules phagocytaires mononucléées, ainsi qu'un co-récepteur. Le récepteur CD4 est une glycoprotéine monomérique de 58 kDa. Le co-récepteur est un membre de la famille des chimiokines à 7 passages transmembranaires couplés aux protéines G (Feng *et al.*, 1996).

L'interaction du co-facteur au complexe gp120/CD4 induit un changement conformationnel qui permet le démasquage de gp41 et la fusion des membranes (Clapham et Weiss, 1997).

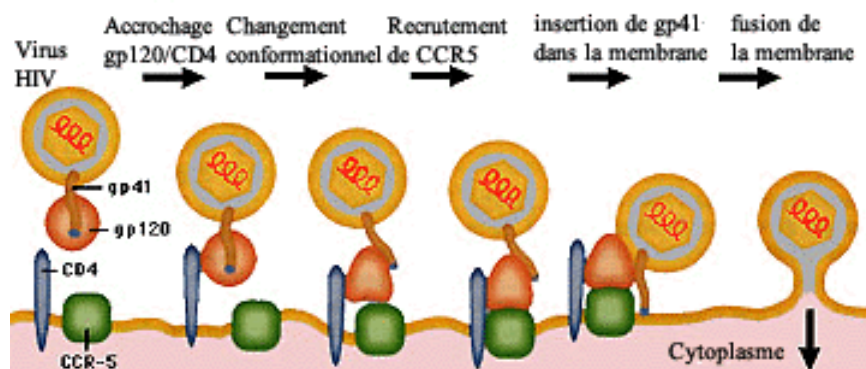


Figure 5 : Schéma des étapes de fixation et de fusion du virus et de la cellule hôte

Après fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique de la cellule cible, la nucléocapside (contenant le génome viral et les enzymes) peut pénétrer dans la cellule cible. Il y a alors élimination des protéines de la nucléocapside, ce qui libère le génome viral et les enzymes. La transcriptase inverse virale catalyse la transcription inverse de l'ARN, formant des hybrides ADN-ARN. La matrice d'ARN étant ensuite dégradée par une activité RNase H de la transcriptase inverse, il y a synthèse d'un second brin d'ADN. Cette étape est fortement régulée, et est sous le contrôle des protéines Vif et NC (nucléocapside). Vif a pour rôle de contrôler l'accrochage de l'amorce spécifique, un t-RNALys, qui permettra par la suite de reconnaître le progénome viral et de l'adresser au noyau de la cellule. L'ADN nouvellement synthétisé (ou progénome) est alors adressé vers le noyau, lié au complexe supramoléculaire protéique : le PIC ou complexe de pré-intégration qui contient l'intégrase, la protéine de matrice, la transcriptase inverse et Vpr qui joue un rôle majeur dans l'import nucléaire (Nie *et al.*, 1998). Le progénome viral est ensuite intégré dans le génome de la cellule hôte, grâce à l'intégrase.

3-2-2- Phase tardive

La phase tardive du cycle correspond aux étapes permettant d'obtenir des virions complets, qui seront capables de bourgeonner et de murer après leur libération dans le milieu extracellulaire. Ce sont les enzymes cellulaires qui, sous l'influence de facteurs d'activation environnementaux (cytokines, antigènes) et viraux propres au VIH, réalisent la transcription de l'ADN proviral. Les fonctions cellulaires sont détournées au profit du virus. Des ARN courts et épissés, codant pour les protéines Tat, Rev et Nef (dites précoces), sont produits. Nef est une protéine accessoire. Tat est un activateur transcriptionnel qui se fixe sur l'ARN en cours de synthèse au niveau de la région TAR (Trans-Activating Response Element), et permet ainsi de recruter différentes protéines cellulaires favorisant l'élongation de la transcription. Rev permet l'export des ARNm non épissés via sa fixation sur le RRE (Rev Responsive Element) des transcrits primaires, et permet le recrutement de l'exportine-1 (Hofmann *et al.*, 2001) et du facteur Ran-GTP (Askjaer *et al.*, 1998). Des ARN non épissés ou simplement épissés, correspondant aux gènes *gag*, *gag-pol* (protéines de structure), *env* (enveloppe), *vif* et *vpr*, sont ensuite produits pour donner des protéines dites tardives. Une fois traduits, les différents composants viraux sont adressés à la membrane cellulaire, s'assemblent pour former un virion qui bourgeonne et finit sa maturation grâce à la protéase dans le milieu extracellulaire (Wieggers *et al.*, 1998).

Dans les cellules quiescentes, l'ADN proviral n'est pas intégré dans le génome de la cellule hôte (cf Introduction Générale, Chapitre 2, Paragraphe 3-1) (Zack *et al.*, 1990).

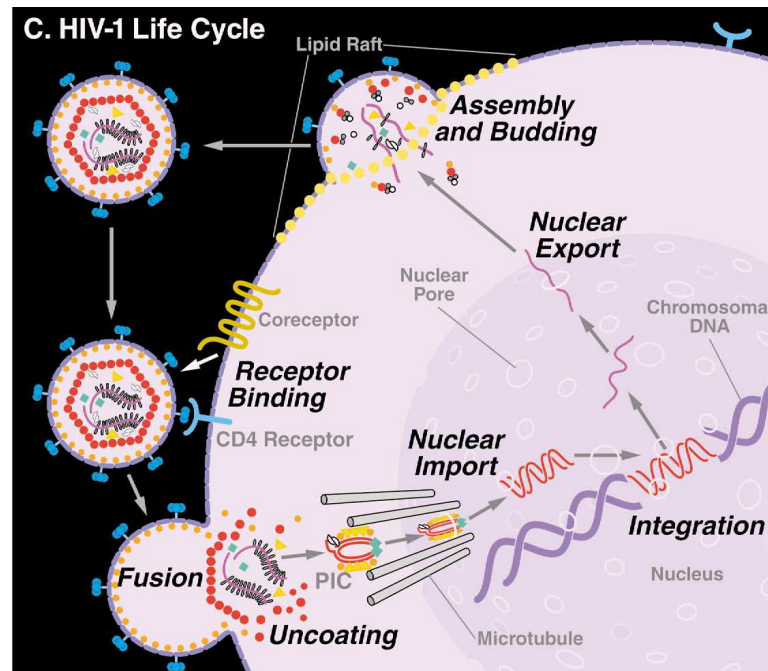


Figure 6 : Schéma des principales étapes du cycle biologique du VIH-1 (d'après Shermann et Greene, 2002)

Particularité de la transcription inverse :

La transcriptase inverse commet continuellement des erreurs lors de la fabrication de l'ADN à partir de l'ARN viral, créant ainsi de nombreux variants génomiques. Aucune réparation n'est possible, que le génome donne naissance à un virus viable ou non.

La conséquence est une extrême variabilité génotypique et phénotypique des virus produits. Les pressions exercées par le système immunitaire et/ou les molécules antirétrovirales permettent, si elles sont insuffisantes, une sélection puis l'émergence de populations virales mutantes échappant aux mécanismes de contrôle mis en place à l'égard de l'infection virale.

4- Physiopathologie de l'infection à VIH

4-1- Cellules cibles

Deux catégories de cellules exprimant la molécule CD4 sont infectées par le VIH.

- les lymphocytes CD4+, dits *T helper*, ayant pour fonction de coordonner l'ensemble des réactions immunes humorales et cellulaires. Ils sont impliqués dans un cycle hautement réplicatif du virus.
- Les cellules présentatrices d'antigènes : monocytes et macrophages, cellules de Langherans, cellules folliculaires dendritiques ganglionnaires, cellules microgliales du système nerveux

central. Elles sont impliquées dans un cycle peu répliatif et participent à la diffusion et la dissémination du virus, elles constituent, entre autres, un pool réservoir du VIH.

Ces diverses cellules sont présentes au sein de tout le système lymphoïde (ganglions, thymus, intestin...) au niveau de la peau, des muqueuses génitales, du placenta, du cerveau... Leur circulation est assurée par les voies lymphatiques et sanguines.

Le VIH infecte les cellules qui portent l'antigène CD4 à leur surface. En effet, il se produit une interaction de haute affinité entre la protéine gp120 de l'enveloppe virale et le marqueur membranaire CD4 de la cellule cible (Klatzmann *et al.*, 1984). La liaison gp120/CD4 n'est toutefois pas suffisante pour assurer l'entrée du VIH dans la cellule (Maddon *et al.*, 1986) : l'expression de co-récepteurs membranaires présents sur les lymphocytes T CD4+ et sur les monocytes est nécessaire à cette pénétration. Ce co-récepteur est la molécule CXCR4 (également appelée fusine) dans le cas des lymphocytes T4 ; il s'agit de la molécule CCR5 dans le cas des monocytes ou des macrophages. De fait, il existe plusieurs souches de VIH : les souches qui utilisent le co-récepteur CCR5 et infectent donc les monocytes et les macrophages (souches à tropisme M) (Alkhatib *et al.*, 1996 ; Deng *et al.*, 1996) ; des souches qui utilisent le corécepteur CXCR4 et infectent préférentiellement les lymphocytes T CD4+ (souches à tropisme lymphocytaire ou tropisme T) (Oberlin *et al.*, 1996).

L'étude approfondie de la protéine gp120 de l'enveloppe virale a permis d'identifier une région appelée boucle V3 qui joue un rôle dans le choix des co-récepteurs utilisés par le virus. Une différence d'un seul acide aminé dans cette boucle de la gp120 pourrait être suffisante pour déterminer le co-récepteur utilisé (Rosen *et al.*, 2006).

Dans l'infection à VIH, le macrophage joue un rôle de réservoir avec la possibilité de transmission directe intercellulaire du virus aux lymphocytes T lors de la présentation de l'antigène. Le tropisme macrophagique permet d'expliquer le neurotropisme du VIH, la présence du virus dans les structures nerveuses des patients asymptomatiques, et la fréquence des symptômes neurologiques et psychiatriques non causés par une affection opportuniste.

D'autres cellules ont été reconnues aussi comme des cibles du VIH : précurseurs médullaires (CD34), certains lymphocytes B, et les cellules intestinales (Folks *et al.*, 1988 ; Malkovský *et al.*, 1988 ; Fantini *et al.*, 1991).

A noter que le récepteur CCR-5 n'est pas fonctionnel chez certaines personnes en raison d'une mutation génétique : une mutation d'un des deux gènes diminuerait de 50% le risque de contracter une infection par le VIH (Huang *et al.*, 1996). Ce récepteur est aussi celui de trois chimiokines (Rantes, MIP1 alpha, MIP1 bêta) qui inhibent l'infection et la réplication du VIH

(Kitai *et al.*, 2000 ; Paliard *et al.*, 1996 ; Cocchi *et al.*, 1995). Donc, une autre voie de traitement consisterait à bloquer ce récepteur par des chimiokines.

4-2- Dynamique de la réplication virale

Selon le type de cellules infectées, deux dynamiques de réplication virale sont observées. Il existe un cycle de réplication rapide où de nouveaux lymphocytes CD4⁺ naïfs sont infectés en permanence, leur demi-vie est estimée à 1 jour. Le cycle de réplication lente concerne les cellules présentatrices d'antigènes, où le virus infecte des cellules à demi-vie plus longue, de 6 à 25 jours pour les macrophages.

Un véritable pool cellulaire réservoir du VIH est représenté par les lymphocytes CD4⁺ mémoire hébergeant le virus sous sa forme d'ADN proviral. Leur demi-vie est estimée à plus de 120 jours pour une population d'un million de cellules.

Ce dernier secteur est d'importance capitale quant aux possibilités d'éradication du VIH. Les antirétroviraux actuels n'agissent que sur un virus en réplication. Le système immunitaire ne peut reconnaître une cellule non activée, n'exprimant pas les antigènes viraux à sa surface et contenant un virus réduit à une simple expression génomique, mais au potentiel infectieux conservé.

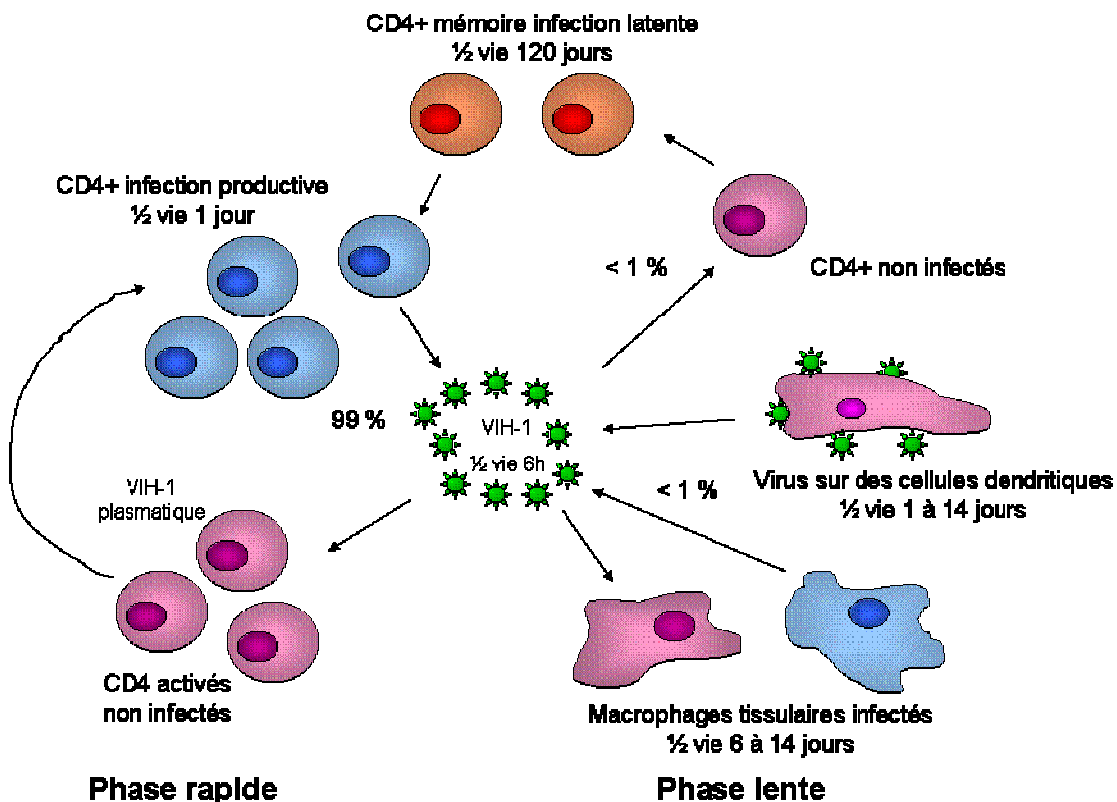


Figure 7 : Dynamique de l'infection in vivo

4-3- Evolution de l'infection à VIH

L'infection par le VIH est chronique et persistante. Il existe trois phases distinctes dans l'évolution de la maladie.

La primo-infection intervient juste après la contamination par le VIH, le nombre de virus présents (charge virale) augmente fortement, puis diminue rapidement du fait de la réponse du système immunitaire.

Lors de la phase asymptomatique, l'individu infecté ne présente aucun symptôme de la maladie. Le nombre de virus n'augmente que très légèrement; mais le nombre de variants augmente fortement, notamment dans les réservoirs viraux. Malgré le contrôle de la maladie par le système immunitaire (réponse humorale et cellulaire), les lymphocytes T sont progressivement détruits par le virus.

Lorsque le SIDA est déclaré, le système immunitaire est débordé; le nombre de virus augmente fortement (mais le nombre de variants se limite aux plus efficaces) ; les symptômes apparaissent.

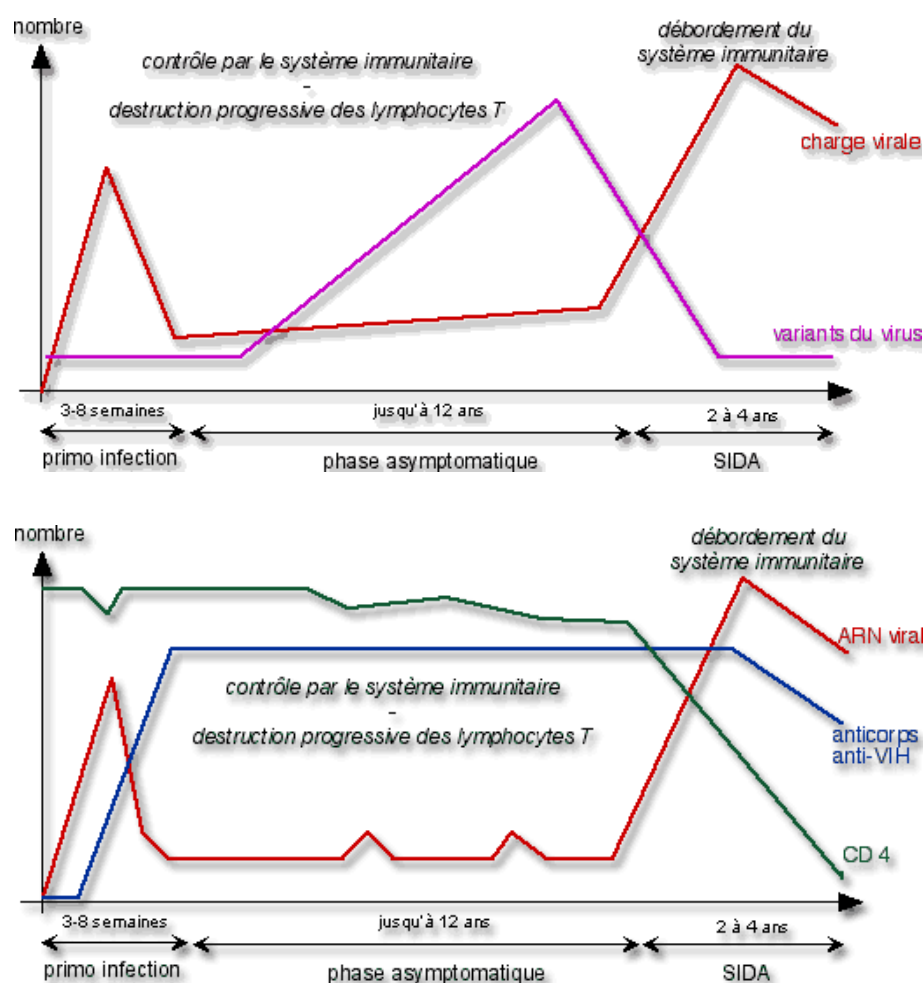


Figure 8 : Evolution des paramètres virologique et immunologique au cours de l'infection à VIH (Dossier : *Le virus du SIDA, Gilles Furelaud*)

Parallèlement à l'évolution de l'infection, un certain nombre de paramètres varie : la quantité de CD4 correspondant au nombre de lymphocytes (elle diminue pendant la phase asymptomatique), la quantité d'ARN viral (correspondant au nombre de virus), et les anticorps anti-VIH. Ces derniers montrent la réaction du système immunitaire face à l'infection par le VIH. Ils apparaissent lors de la primo-infection (qui dure de 3 à 8 semaines).

5- Thérapeutique anti-VIH

En l'absence de vaccin, la thérapie antirétrovirale constitue aujourd'hui l'unique moyen de lutter contre le VIH. Si elle ne permet pas l'éradication complète du virus présent dans l'organisme, elle diminue néanmoins la mortalité et la morbidité grâce à une prévention et/ou une restauration du déficit immunitaire. Le traitement vise donc, d'une part à abaisser la charge virale globale, et d'autre part à stabiliser le nombre de lymphocytes T CD4+, favorisant ainsi un équilibre immuno-virologique.

La stratégie des traitements antirétroviraux est d'inhiber de façon ciblée les différentes étapes du cycle de réplication du VIH afin de prévenir l'infection de nouvelles cellules et la production de virions. Des traitements complémentaires, dits adjuvants, peuvent s'ajouter aux premiers, incluant en particulier l'immunothérapie.

Aujourd'hui, l'initiation du traitement est fondée sur l'évaluation du risque de progression de la maladie (niveau et évolution de la charge virale), l'intensité du déficit immunitaire (taux et évolution du nombre de lymphocytes T CD4+) et l'engagement du patient à suivre son traitement. Ainsi, le commencement d'un traitement est recommandé chez tous les patients symptomatiques ou au stade SIDA, et/ou ayant un nombre de CD4+ inférieur à 200/mm³. Chez les patients asymptomatiques, le traitement est généralement débuté lorsque le taux de CD4+ est en dessous de 350/mm³. Le traitement précoce est quant à lui, controversé, car il pourrait favoriser l'émergence de populations virales résistantes aux antirétroviraux, limitant par la suite le choix des thérapies, et augmenter l'apparition d'effets indésirables à long terme.

5-1- Différents traitements antirétroviraux actuels et à venir

5-1-1- Les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTIs)

Ce sont les premiers antirétroviraux développés. Ils sont actifs sur les VIH-1 et 2. Ce sont des analogues de bases nucléiques. Ils nécessitent pour être actifs d'être phosphorylés dans le milieu intracellulaire. Ils rentrent ensuite en compétition avec les substrats naturels de la transcriptase inverse et inhibent l'action de cette dernière. Ils bloquent ainsi la fabrication d'ADN pro-viral.

Néanmoins, des résistances sont observées, notamment à cause de la survenue de mutations de la transcriptase inverse.

Cette classe d'inhibiteurs comprend l'antirétroviral le plus connu, l'AZT ou zidovudine (RETROVIR®). Il s'agit d'un nucléoside analogue de la thymidine (Nakashima *et al.*, 1986). Il présente une bonne résorption digestive, une élimination rénale et un passage trans-placentaire (Hasegawa *et al.*, 1996 ; Pons *et al.*, 1991). Mais il possède de nombreux effets indésirables, une toxicité hématologique (neutropénies, leucopénies, anémies) et des manifestations digestives (nausées, diarrhées, pancréatites, atteintes hépatiques).

Le ddC ou zalcitabine (HIVID®) est un analogue de la cytosine. Il présente des effets indésirables comme des neuropathies périphériques et des pancréatites.

Le d4T ou stavudine (ZERIT®) est un analogue de la thymidine et présente les mêmes effets secondaires que le ddC.

Le 3TC ou lamivudine (EPIVIR®) est un analogue de la cytidine, il est actif sur les souches résistantes à l'AZT. Mais il présente des effets indésirables tels que l'acidose lactique, la pancréatite, et une toxicité hématologique.

Le FTC ou emtricitabine (EMTRIVA®) est un analogue de la cytidine dont la structure chimique est proche de celle de la lamivudine (un atome de fluor à la place d'un atome hydrogène sur le noyau pyrimidique) ainsi que ses propriétés pharmacologiques.

L'ABC ou abacavir (ZIAGEN®) est un analogue de la guanine.

Le ddI ou didanosine (VIDEX®) est un analogue de l'adénosine.

Ces médicaments sont éliminés par voie rénale. Leur posologie doit donc être ajustée chez le sujet insuffisant rénal ce qui est assez fréquemment rencontré chez le sujet VIH compte-tenu de la possibilité de néphropathie induite par le VIH (Ostrop *et al.*, 1999). Ils présentent également une forte toxicité mitochondriale, liée principalement à leur affinité pour l'ADN polymérase γ mitochondriale humaine (Chen *et al.*, 1991).

Les INTIs sont responsables d'une baisse de la charge virale modérée. Leur action est transitoire avec possibilité d'apparition de résistances. Ils sont souvent associés entre eux ou aux inhibiteurs de la protéase. Des associations d'INTIs ont été développées afin de limiter le nombre de prises quotidiennes de médicaments et ainsi de renforcer l'observance : AZT + 3TC (Combivir®) ou AZT + 3TC + ABC (Trizivir®).

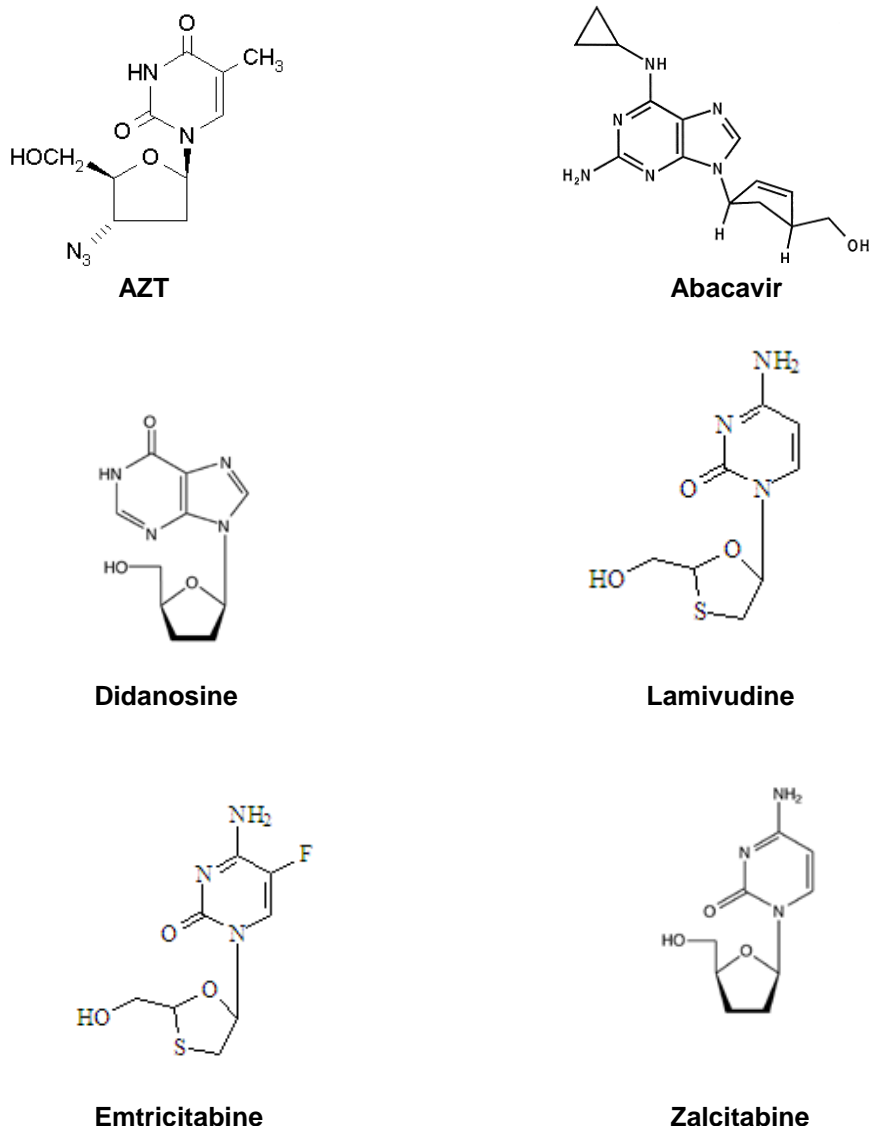
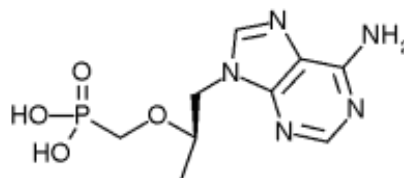


Figure 9 : Structures chimiques d'inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse

5-1-2- Les inhibiteurs nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTIs)

Il s'agit de médicaments fonctionnant de la même manière que les INTIs (analogues de nucléosides). Les INTIs sont des prodrogues qui sont phosphorylés dans la cellule en leur métabolite actif. Ce métabolisme intracellulaire, incluant des étapes cinétiquement limitantes, contrôle les taux intracellulaires d'INTI-triphosphates et donc l'activité antivirale. De plus, des nucléotides biologiquement actifs ne peuvent pas être administrés de façon directe car leur nature poly-anionique empêche leur entrée dans l'organisme et la cellule. Toutefois, une stratégie utilisant des prodrogues, permet de délivrer des analogues nucléotidiques (déjà monophosphorylés). Ainsi, le ténofovir ou TFOV un analogue nucléotidique de l'adénosine, a été commercialisé en 2002. Il est administré sous une

forme prodrogue, le ténofovir disoproxil-fumarate ou TDF (VIREAD®). Le TDF présente un groupement phosphonate qui permet son absorption intestinale. Néanmoins, la biodisponibilité du TDF reste faible (environ 25%) et un repas copieux, protégeant le TDF des sucs gastriques, améliore son passage dans le sang (environ 35 à 40%) (Balimane et Sinko, 1999 ; Kearney *et al.*, 2004). Les groupements protecteurs du TDF sont ensuite aisément hydrolysés par les enzymes plasmatiques, expliquant la présence de TFV au niveau plasmatique (Shaw *et al.*, 1997). L'entrée du TFV au niveau de la cellule, permet de contourner l'étape cinétiquement limitante de monophosphorylation du nucléoside et simplifie l'activation cellulaire du TFV en TFV-diphosphate. La demi-vie intracellulaire du TFV est beaucoup plus longue que celle des INTIs (Robbins *et al.*, 1998). Son élimination est rénale. Il est de plus responsable de toxicité tubulaire rénale (Peyrière *et al.*, 2004).



Tenofovir

Figure 10 : Structure chimique d'un inhibiteur nucléotidique de la transcriptase inverse

5-1-3- Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTIs)

Ces inhibiteurs regroupent une famille de molécules très diverses qui inhibent, de façon non compétitive, l'activité de la transcriptase inverse du VIH par interaction avec un site allostérique (De Clercq, 1998). Contrairement aux INTIs, ils agissent directement, sans activation métabolique. Ils ne sont actifs que sur le VIH de type 1.

Il existe 3 médicaments dans cette classe : la Névirapine (VIRAMUNE®), l'Efavirenz (SUSTIVA®) et la Delavirdine (RESCRIPTOR®).

Leur efficacité a été testée en association avec d'autres traitements anti-rétroviraux notamment les INTIs.

Leur élimination est rénale. Les principaux effets secondaires sont des éruptions cutanéomuqueuses (Névirapine), des hépatites, des troubles neurologiques de type vertige et trouble du sommeil (Efavirenz) (Moura *et al.*, 2008 ; Reid et Dwyer, 2005 ; Kontorinis et Dieterich, 2003).

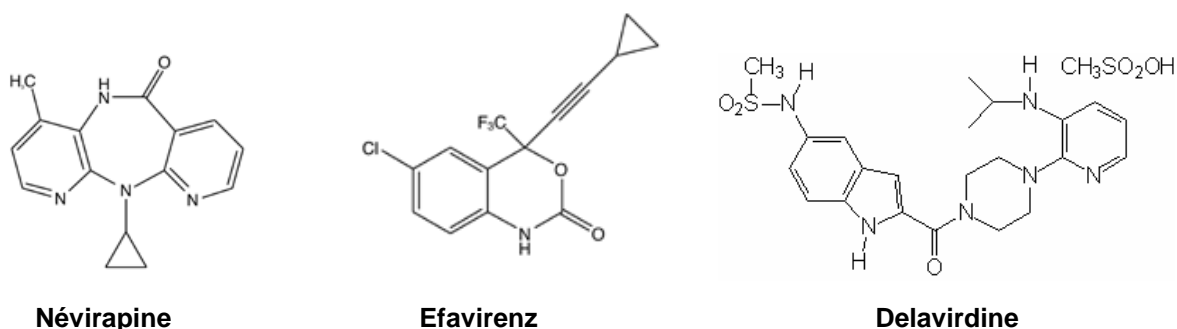


Figure 11 : Structures chimiques d'inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse

5-1-4- Les inhibiteurs de la protéase du VIH (IPs)

Ces molécules constituent un progrès majeur dans la lutte contre le VIH. Comme leur nom le suggère, ces médicaments inhibent l'activité de la protéase du VIH. Les IPs sont particulièrement efficaces lorsqu'ils sont utilisés en association avec des inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse.

Les IPs sont des inhibiteurs spécifiques et réversibles de ces enzymes. Ils entraînent la production de particules virales immatures et non infectieuses. A la différence des INTIs, ils ne nécessitent pas d'activation métabolique intracellulaire et sont donc actifs dans les cellules au repos (Jamjoom, 1991).

Les IPs sont des pseudopeptides analogues structuraux de la séquence peptidique du site de clivage reconnu par la protéase. Ils s'insèrent au site catalytique, à l'interface des deux sous-unités du dimère qui constituent l'enzyme, et bloquent son activité protéolytique de façon sélective et réversible.

Les inhibiteurs de protéase actuellement disponibles sont l'indinavir (CRIVAN[®]), le ritonavir (NORDIR[®]), le nelfinavir (VIRACEPT[®]), le saquinavir (accessible sous deux formes INVIRASE[®], FORTOVASE[®]), le lopinavir/ritonavir (KALETRA[®]), l'atazanavir (REYATAZ[®]). La forme d'administration de l'amprénavir (huit gélules de 150 mg à prendre toutes les douze heures) la rend difficile d'usage. Il a été remplacé par le fosamprenavir (TELZIR[®]). Tipranavir (APTIVUS[®]) et darunavir (PREZISTA[®]) sont les deux derniers nés de cette classe de médicament.

Ces inhibiteurs inhibent la protéase du VIH de type 1 et 2 (saquinavir, ritonavir), ou préférentiellement de type 1 (indinavir, nelfinavir) (Vella, 1995 ; Adje-Touré *et al.*, 2003 ; Witvrouw *et al.*, 2004).

Divers effets indésirables peu spécifiques : troubles digestifs, neurosensoriels, cutanés parfois graves, ont été répertoriés. Un autre effet indésirable est l'apparition d'une résistance croisée aux inhibiteurs

des protéases. L'indinavir peut donner une lithiase urinaire par cristallisation se traduisant par des douleurs lombaires avec ou sans hématurie.

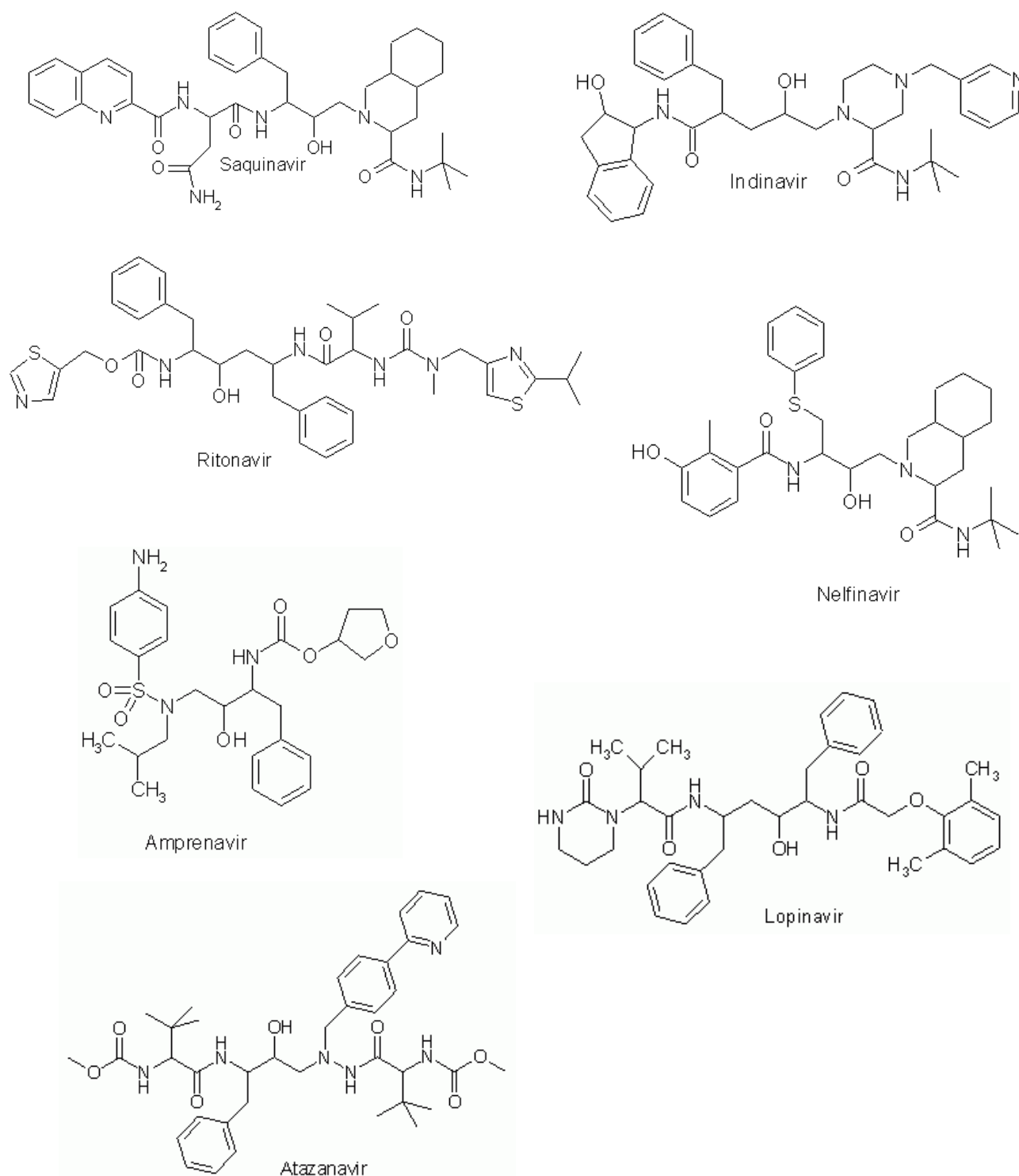


Figure 12 : Structures chimiques d'inhibiteurs de la protéase du VIH

5-1-5- Les inhibiteurs de fusion

L'enfuvirtide (appelé également pentafuside, T-20 ou FUZEON®) est le premier médicament de cette nouvelle classe d'inhibiteurs. Contrairement aux autres antirétroviraux qui agissent à l'intérieur de la cellule, l'enfuvirtide est un polypeptide synthétique de 36 acides aminés, qui se fixe sur la région triple hélice de la gp41 du VIH, stabilisant sa conformation, il bloque son activité fusiogène et empêche ainsi l'infection des cellules cibles (James, 1998 ; Chen *et al.*, 2002). La résistance à l'égard des antirétroviraux connus jusqu'ici ne semble pas s'appliquer (résistance croisée) à l'enfuvirtide, vraisemblablement en raison de son mécanisme d'action distinctif (Roman *et al.*, 2003 ; Olson et Maddon, 2003). Par contre, des mutations du VIH associées à une diminution de la sensibilité du virus à l'enfuvirtide ont été observées (Wei *et al.*, 2002).

5-1-6- Les inhibiteurs de l'entrée du VIH

Il existe des inhibiteurs de l'interaction CD4/gp120. La première étape de l'entrée du virus est la fixation de la particule virale sur une cellule par une liaison spécifique entre la glycoprotéine d'enveloppe, la gp120, et le récepteur CD4 présent dans la membrane cellulaire de certaines cellules de l'immunité (lymphocytes T4 et macrophages). Il a été proposé d'utiliser le récepteur CD4 sous forme soluble pour bloquer les particules virales. Cette approche rencontre depuis peu un certain succès avec la conception d'une molécule développée sous l'appellation PRO 542 (*Progenics Pharmaceutical*) qui a démontré une bonne activité antivirale en phase I/II. Les études se poursuivent actuellement (Jacobson *et al.*, 2000 ; Jacobson *et al.*, 2004).

Des études sont réalisées sur des inhibiteurs de l'interaction gp120/co-récepteur. La seconde étape du cycle viral implique la fixation de la gp120 sur un co-récepteur qui peut être soit le récepteur CCR5, soit le récepteur CXCR4, selon le type cellulaire infecté.

Le potentiel thérapeutique des ligands de CCR5, susceptible de bloquer l'interaction gp120/CCR5, s'est imposé lorsque des individus porteurs d'un récepteur inactif, résistants à l'infection par le VIH, ont été découverts. Le maraviroc (CELSENTRI®) est le premier antagoniste de CCR5 mis sur le marché. Il agit de façon synergique avec les inhibiteurs de transcriptase inverse et de protéase (Ketas *et al.*, 2007).

Il existe également un antagoniste puissant du CXCR4, l'AMD070 (*Anormed*) qui empêche la fixation du ligand naturel du co-récepteur. Son action semble également additive ou synergique en combinaison avec les inhibiteurs de fusion, de la transcriptase inverse et de la protéase (Stone *et al.*, 2007).

5-1-7- Les inhibiteurs de l'intégrase

L'intégrase du VIH est une enzyme qui catalyse l'incorporation de l'ADN proviral dans l'ADN de l'hôte, étape cruciale du cycle de réplication du virus. Des chercheurs ont mis au point de nouveaux inhibiteurs de l'intégrase. Ces inhibiteurs, possédant le noyau styrylquinoléine, ont montré une excellente activité anti-intégrase *in vitro*. Ils bloquent la réplication du VIH en culture cellulaire et sont dénués de cytotoxicité (D'Angelo *et al.*, 2001). Ils ouvrent ainsi de nouvelles perspectives pour le développement d'antiviraux destinés au traitement du SIDA.

Trois inhibiteurs existent en 2007 : le raltégravir, l'elvitégravir et le MK-2048. LA Commission européenne et l'Agence française de Sécurité sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) viennent d'autoriser la mise sur le marché du raltégravir (Isentress®).

5-1-8- Les molécules en développement clinique

Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse

L'étravirine (TMC 125) et la rilpivirine (TMC 278) ont, par rapport aux INNTIs actuellement disponibles, une barrière génétique à la résistance augmentée et resteraient actives sur des souches présentant des mutations de résistance aux INNTIs (Boone, 2006 ; Vingerhoets *et al.*, 2005). L'étravirine est évaluée en phase III et dans certains cas en association avec le darunavir (Boffito *et al.*, 2007). La rilpivirine est en phase II et susceptible d'être administrée en une prise quotidienne.

Inhibiteurs de protéase

Le brécanavir (GW 640385) est un inhibiteur de protéase actif *in vitro* sur des souches virales résistantes à d'autres inhibiteurs de protéase (Hazen *et al.*, 2007). Il est développé en administration biquotidienne avec du ritonavir.

Inhibiteurs de la maturation

Le PA-457 est le premier composé de cette classe en développement clinique (Salzwedel *et al.*, 2007). Ce dérivé de l'acide bétulinique stoppe la maturation de la capsid virale en bloquant la conversion du précurseur de la capsid (p25) en protéine de la capsid mature (p24), ce qui aboutit à la libération de particules virales immatures non infectieuses. La diminution de la charge virale en monothérapie à 200 mg/j est de l'ordre de 1 log.

5-2- Pharmacologie des traitements antirétroviraux

Le suivi thérapeutique pharmacologique occupe désormais une place importante dans le domaine de la recherche tant clinique que fondamentale. Plusieurs raisons plaident en faveur de la nécessité de telles études pharmacologiques (Azoulay *et al.*, 2005):

- le nombre grandissant d'antirétroviraux disponibles et les choix multiples de combinaisons qui en découlent
- l'efficacité des antirétroviraux. Même si la survie et l'amélioration des conditions de vie des patients se sont grandement améliorées, de nombreuses études cliniques montrent que 50 % d'entre eux n'ont pas une charge virale en ARN satisfaisante (inférieure à 50 copies/mL).
- la présence de nombreux effets secondaires indésirables

Il existe une grande variabilité interindividuelle des concentrations plasmatiques et intracellulaires. L'uniformité des doses prescrites ne prend pas en compte les différences métaboliques observées d'un patient à l'autre. Le suivi thérapeutique pharmacologique, au travers des dosages plasmatiques et/ou intracellulaires, permet d'optimiser la posologie des antirétroviraux afin d'individualiser les traitements et de définir une relation adéquate entre la dose administrée et l'effet thérapeutique ou toxique.

5-2-1- Les inhibiteurs de la transcriptase inverse (INTI, INtTI et INNTI)

Les principaux paramètres pharmacologiques des inhibiteurs de la TI sont rassemblés dans le tableau 2.

Les INTIs et les INNTIs sont rapidement absorbés au travers de la barrière gastro-intestinale. Leur biodisponibilité orale est en général bonne : elle varie de 60 à 90 %, excepté pour la didanosine (ddI) et le tenofovir.

La concentration plasmatique maximale (C_{max}) des INTIs est atteinte entre 0,5 et 2 heures après la prise. Ils se fixent peu sur les protéines plasmatiques et sont éliminés tels quels dans les urines, sauf la zidovudine (AZT) (Moore *et al.*, 1995 ; Singlas *et al.*, 1989) et l'abacavir (McDowell *et al.*, 1999), éliminés en partie sous forme de glucuronides.

La demi-vie intracellulaire des formes triphosphorylées est importante et nettement supérieure à celle des analogues nucléosidiques correspondants, présents dans le plasma ; par exemple 7 heures pour l'AZT-TP et la stavudine-TP (d4T-TP) (Becher *et al.*, 2004) et 22 heures pour la lamivudine-TP (3TC-TP) (Rodriguez *et al.*, 2000).

Les INNTIs, métabolisés par les cytochromes hépatiques, ont la particularité d'avoir une demi-vie prolongée et une liaison aux protéines plasmatiques assez importante. Leur C_{max} est atteinte environ 3 heures après la prise.

Antirétroviral	Biodisponibilité orale (%)	T _{max} (h)	T _{1/2} (h)	Liaison protéine (%)
<i>Inhibiteurs nucléosidiques de la TI</i>				
Zidovudine	63 ± 10	0,5-1	0,9-1,4	20
Zalcitabine	75 ± 5	1	1,2 ± 0,6	nd
Didanosine	30 ± 10	1	0,5 -2	< 5
Stavudine	82-99	0,5-0,75	1-1,6	0
Abacavir	76-100	0,7-1,7	0,8-1,5	nd
Tenofovir	40	2,5 ± 0,5	14	< 10
<i>Inhibiteurs non nucléosidiques de la TI</i>				
Névirapine	90	2-3	30	60
Efavirenz	50	2-5	50	99
Delavirdine	85	nd	nd	98

nd : non disponible

Tableau 2 : Principaux paramètres pharmacocinétiques des inhibiteurs de la transcriptase inverse (Azoulay *et al.*, 2005)

Concernant les INTIs, il ne semble pas y avoir de corrélation entre les formes phosphorylées intracellulaires et le nucléoside présent dans le plasma (Azoulay *et al.*, 2005). Par contre, le dosage des formes triphosphorylées des INTIs pourrait être un bon marqueur de succès ou d'échec virologique. Par exemple, l'équipe d'Anderson a montré qu'un taux d'AZT triphosphate supérieur à 30 fmol/10⁶ cellules est prédictif d'une bonne réponse virale (charge virale inférieure à 50 copies/mL). Elle a également mis en évidence qu'une concentration supérieure à 7017 fmol/10⁶ cellules de 3TC-TP était prédictive d'une réponse virale plus longue (Anderson *et al.*, 2003).

En ce qui concerne l'efavirenz, une étude a montré que l'échappement thérapeutique pouvait être lié à une concentration résiduelle (C_{res}) faible (< 1 µg/ml), tandis qu'à une C_{res} élevée (> 4 µg/ml) correspondrait des effets secondaires au niveau du système nerveux central (Marzolini *et al.*, 2001). L'équipe de Brundage a pu montrer, chez 50 enfants, que la C_{res} de l'EFV au bout de 6 semaines de traitement était prédictive de la réponse virologique sur une année (Brundage *et al.*, 2004).

D'autres équipes ont pu montrer que le succès ou l'échec d'un traitement avec la névirapine (NVP) étaient associées à sa concentration plasmatique (Veldkamp *et al.*, 2001 ; Duong *et al.*, 2005).

5-2-2- Les inhibiteurs de la protéase (IPs)

Le tableau 3 regroupe les principaux paramètres pharmacologiques des inhibiteurs de la protéase.

Les IPs sont rapidement métabolisés au niveau intestinal et hépatique, principalement par les cytochromes P450 (CYP) 3A4 (Huang *et al.*, 2001), mais aussi par les CYP3D6 et CYP2C9 (Moyle et

Back, 2001). De ce fait, la biodisponibilité des IPs, notamment du saquinavir (SQV) et du lopinavir (LPV), est inférieure à celle des INTIs et des INNTIs.

Par ailleurs, des modulations de l'activité de CYP3A4 peuvent induire de grandes différences. Ainsi, l'administration de molécules stimulant l'activité des CYP3A4 diminue la concentration plasmatique d'IPs tandis que des molécules inhibitrices de cette même activité ont un effet inverse (Acosta, 2002). La plupart des IPs inhibent à des degrés divers l'activité de l'isoenzyme CYP3A4. Le ritonavir s'est révélé être un puissant inhibiteur des CYP 3A4 et CYP 2D6 et dans une moindre mesure des CYP 2C9/10 (Kumar *et al.*, 1996). Il est depuis administré à faible dose en combinaison avec les autres IPs afin d'augmenter leur demi-vie en diminuant leur élimination hépatique par les cytochromes (Condra *et al.*, 2000 ; Kempf *et al.*, 1997). On parle alors de régime « boosté ».

De plus, contrairement aux INTIs, les IPs, excepté l'indinavir (IDV), sont fortement liés (90-99 %) aux protéines plasmatiques, principalement l'albumine et les acides α -1-glycoprotéiques (Owen et Khoo, 2004 ; Anderson *et al.*, 2000 ; Jones *et al.*, 2001-b). La concentration de ces glycoprotéines peut varier considérablement en réponse aux différents épisodes inflammatoires liés à l'infection par le VIH. Elle est dépendante de l'ethnie, du poids, de l'âge des individus et même du moment de la prise dans la journée.

Antirétroviral	Biodisponibilité orale (%)	T _{max} (h)	T _{1/2} (h)	Liaison protéine (%)	C _{res} * efficace (µg/mL)
Ritonavir	70	3,3 ± 2,2	4 ± 1	99	
Indinavir	60	0,8 ± 0,3	1,8 ± 0,4	60	0,15-0,8
Lopinavir	< 10	4 ± 0,5	5 ± 1	99	3-8
Amprénavir	30	1,9 ± 1,0	8,9 ± 1,8	90	0,375-3
Saquinavir	4-10	2,5 ± 0,5	nd	97	0,2-4
Nelfinavir	60	2,8 ± 1,0	4,0 ± 0,6	98	1-4
Atazanavir	68	2,5	6,5 ± 2,6	86	0,2-1

* Prise en charge thérapeutique des personnes infectées par le VIH. Rapport 2004 Médecine-Science Flammarion.
nd : non disponible

Tableau 3 : Principaux paramètres pharmacocinétiques des inhibiteurs de la protéase (Azoulay *et al.*, 2005)

En ce qui concerne les concentrations intracellulaires, dans les lignées lymphoblastiques, l'hydrophobicité des IPs est partiellement responsable du degré variable de leur accumulation dans ces cellules : nelfinavir > saquinavir > lopinavir > ritonavir > indinavir (Jones *et al.*, 2001-c). Les mécanismes d'entrée ne sont pas connus, mais il est possible que le caractère lipophile des IPs permette une diffusion passive à travers les membranes cellulaires.

La pénétration, l'accumulation mais aussi l'efflux des IPs influencent leurs concentrations intracellulaires. Nous développerons le rôle et l'importance de ces transporteurs dans l'efflux des antirétroviraux dans le chapitre 3 de l'Introduction Générale.

Le dosage plasmatique des IPs semble être un marqueur intéressant du succès ou de l'échec virologique (Breilh *et al.*, 2004 ; Gatti *et al.*, 2002 ; Dumon *et al.*, 2000 ; Burger *et al.*, 1998 ; Anderson *et al.*, 2002-a ; Pellegrin *et al.*, 2002), ainsi que de la présence d'effets secondaires (Gutierrez *et al.*, 2003 ; Gutierrez *et al.*, 2004).

5-3- Les polychimiothérapies antirétrovirales

Aujourd'hui des multithérapies, traitements antirétroviraux hautement actifs (Highly Active Antiretroviral Therapy, HAART) sont utilisées par les cliniciens. L'utilisation de plusieurs médicaments de plus en plus puissants est motivée par les capacités du virus à muter et créer des résistances face aux diverses molécules qui perdent alors de leur efficacité. En effet lors de la transcription de l'ARN viral en ADN, la transcriptase commet des erreurs créant ainsi des virus mutants, certaines mutations entraînant une baisse de la sensibilité du virus aux médicaments (Bakhanashvili *et al.*, 1996). Le virus se multipliant jusqu'à plusieurs milliards de fois dans l'organisme chaque jour, le rôle des multithérapies est notamment de réduire considérablement et si possible rapidement cette multiplication, limitant ainsi également les possibilités de mutation virale et les phénomènes de résistance.

L'utilisation de ces associations médicamenteuses lors d'un premier traitement antirétroviral, permet de rendre la charge virale plasmatique indétectable en moins de 3 mois, chez 80% des patients traités. Pour un premier traitement antirétroviral, il convient de recourir à une association de trois antirétroviraux (trithérapie), en faisant appel à l'un des schémas suivants (tableau 2) :

- 2 inhibiteurs nucléosidiques ou nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTIs) + 1 inhibiteur de la protéase (IP) ou 2 INTIs + 1 inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse (INNTI) (schéma privilégié)
- 3 INTIs : l'association *zidovudine* + *lamivudine* + *abacavir* est généralement prescrite ; elle doit être réservée aux seuls patients ayant une charge virale inférieure à 100 000 copies/ml, ayant une contre-indication à une trithérapie avec IP ou INNTI (par exemple, co-prescription d'un traitement antituberculeux contenant de la rifampicine)

Il existe de nombreuses options validées en termes d'efficacité viro-immunologique. Dans le choix d'un premier traitement antirétroviral, il faut maintenant prendre en compte d'autres éléments, tels que la tolérance immédiate, la tolérance à long terme, la simplicité de prise et les conséquences d'un échec sur les options ultérieures (Rapport « Prise en charge médicale des personnes infectées par le VIH », sous la direction du Pr P. Yeni, 2006).

2 INTIs			+	1 INNTI ou 1 IP "boosté"		
AZT ou TFV ou ddl ou ABC	+	3TC ou FTC	+	EFV ou NVP	ou	Fos-APV ou IDV ou LPV ou ATV ou NFV ou TPV + RTV
3 INTIs		AZT + 3TC + ABC				

Tableau 4 : Exemples d'associations recommandées pour un premier traitement antirétroviral

Les traitements de deuxième ou troisième intention sont proposés en fonction de leur efficacité, après évaluation à l'aide de tests génotypiques de résistance, afin de s'assurer de l'absence de résistance croisée entre les médicaments précédemment prescrits et la nouvelle association.

Enfin, l'interruption thérapeutique peut être envisageable chez des patients souffrant d'effets indésirables importants associés à une excellente réponse virologique et immunologique (charge virale indétectable et nombre de CD4 supérieur à 400-500/mm³). Cette interruption est éventuellement précédée ou entretenue par une immunothérapie qui permet de stimuler la réponse immunitaire dans le cadre de la recherche clinique (Imami *et al.*, 2002).

Chapitre 2

Echappement thérapeutique

L'échec thérapeutique regroupe des situations très diverses, qu'il s'agisse d'un échec virologique résultant d'une réplication virale persistante sous traitement, d'un échec immunologique avec persistance d'un déficit immunitaire ou d'un échec clinique qui associe habituellement un échec virologique et une détérioration immunitaire. Actuellement, 5 à 6 % des patients infectés par le VIH-1 et bénéficiant d'un traitement antirétroviral, sont en échec thérapeutique sévère, défini par une charge virale $> 30\,000$ copies/ml et des lymphocytes CD4 $< 200/\text{mm}^3$ (Rapport 2004 du Pr Delfraissy).

L'échec virologique constitue la situation la plus fréquente. Il pourrait être défini, au sens strict du terme, comme toute valeur de la charge virale plasmatique au-dessus du seuil de détection. En pratique, l'échec virologique est classé en fonction du niveau de charge virale (CV).

- Échec virologique minime : CV $< \text{à } 5\,000$ copies/ml
- Échec virologique modéré : CV comprise entre 5 000 et 30 000 copies/ml
- Échec virologique majeur : CV $> \text{à } 30\,000$ copies/ml

En règle générale, l'échec virologique résulte d'une inhibition sub-optimale de la réplication virale pouvant être liée :

- à une concentration plasmatique ou intracellulaire insuffisante de(s) molécule(s) antirétrovirale(s) le plus souvent par défaut d'observance, parfois en raison de posologies inadaptées, d'interactions médicamenteuses, de l'activité de systèmes actifs d'efflux
- à l'existence de mutations de résistance vis-à-vis d'une ou de plusieurs molécules antirétrovirales

Les mécanismes qui conduisent à l'échec virologique sont d'origine multifactorielle et le plus souvent évolutifs dans le temps. Au début d'un traitement, c'est le plus souvent un défaut d'observance qui conduit à la persistance d'une réplication virale, puis s'installent progressivement des mutations de résistance qui vont ultérieurement réduire l'efficacité antivirale des molécules. Toutes les classes d'antirétroviraux ne sont pas comparables en termes d'induction de résistance. Lors de la réplication, la résistance survient très rapidement avec des molécules comme le 3TC dans la classe des inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse ou avec les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (Efavirenz, Nevirapine) (Clavel et Hance, 2004).

L'échec immunologique est défini par l'absence d'augmentation des lymphocytes CD4 malgré un traitement antirétroviral efficace depuis au moins 6 mois. Celui-ci s'observe plus fréquemment chez

les patients dont le taux de lymphocytes CD4 était initialement bas. Cet échec immunologique peut s'accompagner d'un succès virologique (charge virale indétectable) ou d'un échec virologique (Katlama *et al.*, 2002).

L'échec clinique se caractérise par la survenue de manifestations cliniques, témoin de la progression de la maladie (symptômes liés au VIH, nouvelle infection opportuniste ou rechute d'une infection préexistante, survenue de tumeurs). Habituellement, cet échec clinique s'accompagne d'un échec immuno-virologique (lymphocytes CD4 effondrés et charge virale élevée). Cependant, un lymphome ou une maladie de Hodgkin, une maladie de Kaposi peuvent survenir chez un patient bien contrôlé au plan virologique et dont le niveau immunitaire est satisfaisant ($CD4 > 300/mm^3$).

1- Observance au traitement antirétroviral

Une observance très stricte au traitement antirétroviral est nécessaire pour supprimer la réplication virale de façon durable et éviter l'apparition de souches virales résistantes (Bangsberg *et al.*, 2003). Cependant, la lourdeur et la complexité des traitements, ainsi que les nombreux effets secondaires conduisent parfois à une mauvaise observance, voir même à l'abandon des traitements par les patients. L'apparition des traitements à un comprimé en une seule prise quotidienne va permettre d'améliorer cette observance, et montre déjà des effets bénéfiques.

Les principaux effets secondaires actuellement identifiés sont :

- le syndrome de lipodystrophie et ses conséquences probables sur le système cardiovasculaire, mettant principalement en cause les IPs et dans une moindre mesure les INTIs (notamment la d4T)
- les atteintes mitochondriales, exposant au risque d'acidose lactique, qui sont associées à l'administration des INTIs
- la dyslipidémie, l'intolérance au glucose, l'hépatite, la neuropathie périphérique, la néphrolithiase...

2- Résistance aux antirétroviraux

La résistance aux antirétroviraux est liée à la sélection de quasi-espèces virales comportant des mutations dans les gènes des protéines virales (gp41, transcriptase inverse, protéase du VIH-1...) lorsque la réplication virale persiste en présence de l'antirétroviral (Menendez-Arias, 2002). La sélection de mutations de résistance dépend de facteurs pharmacologiques (concentrations sub-

thérapeutiques d'antirétroviral, interactions médicamenteuses), de la puissance du traitement antiviral, et de la « barrière génétique » du virus vis-à-vis des différents antirétroviraux, c'est-à-dire du nombre de mutations virales requises pour que le virus devienne résistant (Blaise *et al.*, 2002 ; Young *et al.*, 1998).

Le risque de sélectionner des mutations de résistance diffère selon les antirétroviraux, même à l'intérieur d'une même classe. Les mutations diminuent la sensibilité aux antirétroviraux par des mécanismes différents selon les classes et même selon l'antirétroviral dans une même classe (Clavel et Hance, 2004 ; Hirsch *et al.*, 2003).

2-1- Résistance aux inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse

Deux mécanismes différents sont impliqués dans la résistance aux inhibiteurs nucléosiques (INTIs) et nucléotidiques (INtTIs).

La diminution d'incorporation des nucléosides ou nucléotides artificiels au profit de nucléotides naturels est observée avec certaines mutations. En particulier, la mutation M184V (la méthionine au codon 184 de la transcriptase inverse (TI) est remplacée par une valine) sélectionnée par la lamivudine (3TC) et l'emtricitabine (Borrito-Esoda *et al.*, 2007). La méthionine 184 est située dans le site catalytique de la TI et son remplacement par une valine interfère avec le positionnement de la 3TC (Gao *et al.*, 2000).

L'excision de l'analogue nucléosidique déjà incorporé est conférée par les mutations appelées TAMs (thymidine analog mutations). Elles sont sélectionnées par les analogues de la thymidine, AZT et d4T, et comprenant : M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F et K219Q/E (Mouroux *et al.*, 2000). Les TAMs sont responsables d'une résistance à l'ensemble des inhibiteurs nucléosidiques sauf la 3TC. Cette résistance croisée est variable en fonction du nombre de TAMs et de l'inhibiteur (Whitcomb *et al.*, 2003). Par ailleurs, les mutations K70R et K219Q/E ont moins d'impact que les quatre autres dans cette résistance croisée. La mutation M184V, en présence de TAMs, augmente la résistance *in vivo* à l'abacavir et n'a pas d'impact sur le ténofovir ni sur la didanosine (White *et al.*, 2002 ; Marcelin *et al.*, 2003) (figure 13-A).

2-2- Résistance aux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse

Ces molécules bloquent la TI en se fixant au niveau d'une poche hydrophobique étroite et proche du site actif de l'enzyme (figure 13-B). Une seule mutation à ce niveau va entraîner une résistance de haut niveau à l'ensemble des molécules de cette classe. Chez un patient échappant à un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse (INNTI), tous les composés de cette classe perdent définitivement leur activité. Par exemple, la delavirdine sélectionne *in vitro* la mutation P236L qui

confère une sensibilité accrue à tous les autres INNTIs (Dueweke *et al.*, 1993). Des INNTIs de deuxième génération (tel TMC 125) sont en cours d'évaluation mais il est encore trop tôt pour savoir s'ils seront actifs quand les patients ont déjà échappé à un composé de la première génération.

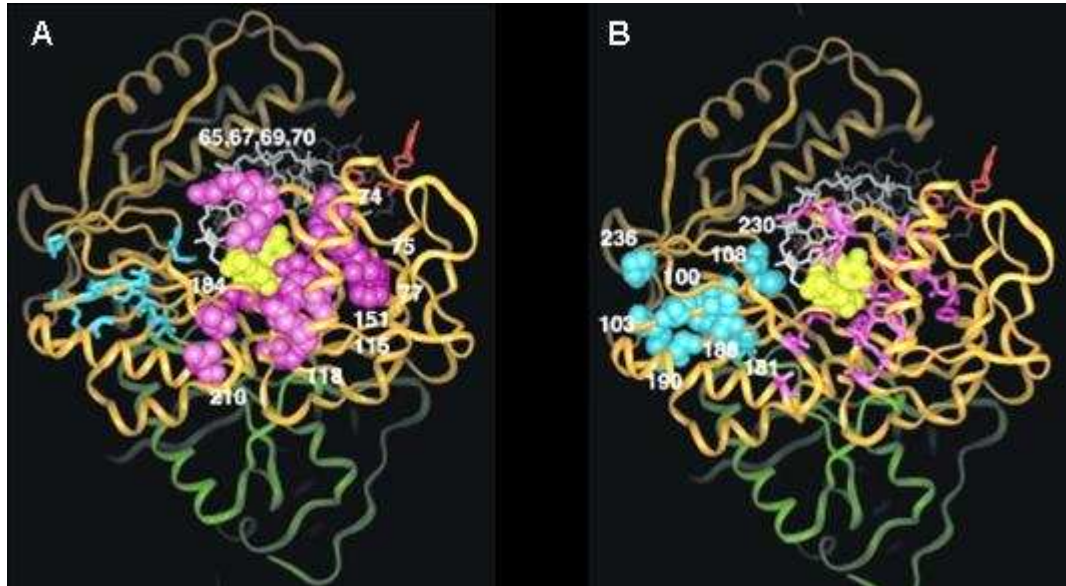


Figure 13 : Structure cristallographique de la transcriptase inverse du VIH-1 complexée à une molécule d'ADN double brin (brin néosynthétisé en rouge et brin matrice en blanc) et un dTTP (deoxythymidine-5'-triphosphate, sphères jaunes). Les sous unités p66 (orange) et p51 (vert) de la TI sont sous forme de rubans. Les acides aminés impliqués dans la résistance aux analogues nucléosidiques sont représentés par des sphères magenta dans la figure A ; ceux impliqués dans la résistance aux analogues non nucléosidiques par des sphères bleues dans la figure B (Menendez-Arias, 2002).

2-3- Résistance aux inhibiteurs de la protéase

La résistance aux inhibiteurs de la protéase (IPs) est liée à des mutations situées au niveau ou à distance du site actif de cette enzyme (figure 14) (Ala *et al.*, 1997). Typiquement, la résistance aux IPs est un phénomène graduel avec accumulation progressive de mutations. Les mutations les plus communément observées sont les mutations L90M, L10I et V82A/T/F (Young *et al.*, 1998). Il existe des mutations primaires sélectionnées en premier lors d'un échappement, très souvent situées au niveau du site actif de l'enzyme, et les mutations secondaires qui viendront s'accumuler pour renforcer la résistance (Menendez-Arias, 2002). Certaines de ces mutations primaires sont spécifiques d'un IP ; c'est le cas de la mutation D30N sélectionnée uniquement par le nelfinavir et qui n'entraîne pas de résistance croisée vis-à-vis des autres IP (mais 30% des patients échappant à cet IP ont un virus

porteur de la mutation L90M impliquée dans la résistance à de nombreux IPs) (Sugiura *et al.*, 2002). C'est le cas aussi de la mutation I50V sélectionnée par l'amprénavir qui peut contribuer à la résistance au lopinavir (Prado *et al.*, 2002). L'atazanavir sélectionne chez des patients naïfs la mutation I50L qui, *in vitro*, n'entraîne pas de résistance croisée (Colonno *et al.*, 2004 ; Pellegrin *et al.*, 2006). Par contre chez des patients ayant déjà reçu d'autres IPs, d'autres mutations vont être sélectionnées par l'atazanavir, en particulier la mutation I84V responsable de résistance croisée (Gong *et al.*, 2000). Les autres IPs sélectionnent des mutations responsables de résistance croisée, en particulier les mutations V82A/F/S/T, I84V/A et L90M qui, lorsqu'elles sont associées, rendent difficiles le choix d'un traitement de relais (Mo *et al.*, 2007). Cependant, des résultats récents montrent clairement qu'il existe une grande différence entre les IPs potentialisés par le ritonavir, dont la barrière génétique est élevée, et les IPs non potentialisés, en termes de taux de sélection de mutations de résistance chez les patients naïfs d'antirétroviraux. Les échappements aux IPs non potentialisés s'accompagnent dans un certains nombre de cas de sélection de mutations de résistance (50% des cas avec le nelfinavir, 16% des cas avec l'atazanavir). En revanche, les échappements aux IPs potentialisés qui ont pu être analysés chez les patients naïfs sous lopinavir/ritonavir et sous fosamprénavir/ritonavir ne s'accompagnent d'aucune sélection de mutation dans la protéase (Kempf *et al.*, 2004). Parmi les nouveaux IPs, le tipranavir semble sélectionner, chez les patients prétraités, les mutations L10I/V, K20M/L/T, L33I/F/V, M46I, I54V, V82L/T, I84V qui sont des mutations impliquées et sélectionnées par beaucoup d'autres IPs (Muzammil *et al.*, 2007). *In vitro*, le TMC 114 sélectionne les mutations R41T et K70E dans la protéase. Ces mutations ne sont habituellement pas sélectionnées par les autres IPs (De Meyer *et al.*, 2005).

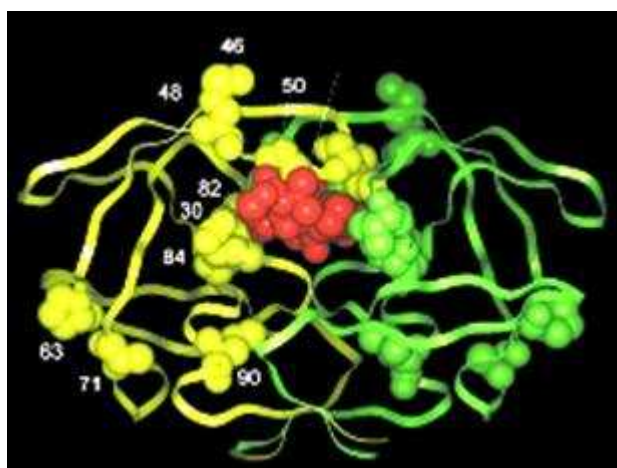


Figure 14 : Structure cristallographique de la protéase du VIH-1 complexée à un inhibiteur (sphères rouges). Les deux sous-unités de la protéase sont représentées par des rubans jaunes et verts. Les sphères vertes et jaunes représentent les acides aminés impliqués dans l'acquisition de résistance. Les résidus 63 et 71, à l'extérieur du site de liaison, ont un rôle secondaire dans la résistance aux antirétroviraux (Menendez-Arias, 2002).

2-4- Resistance aux inhibiteurs de fusion

La résistance au T20, inhibiteur de fusion, est associée à des changements des acides aminés 36 à 45 du domaine HR1 de la protéine virale gp41 (Miller *et al.*, 2004 ; Carmona *et al.*, 2005). Certaines équipes ont également décrit des mutations dans le domaine HR2, voire dans la protéine gp120, qui *in vitro* semblent liées à la résistance au T20 (Jenwitheesuk et Samudrala, 2005). Il n'existe pas de résistance croisée entre le T20 et d'autres inhibiteurs d'entrée tels que les inhibiteurs de CCR5, CXCR4.

3- Les réservoirs viraux

Après l'arrêt des thérapies hautement actives (HAART) chez les patients infectés par le VIH, le virus réapparaît très rapidement. Cette réémergence indiquerait l'existence de réservoirs viraux dans l'organisme des patients. Ces réservoirs représentent donc une barrière majeure à l'éradication du virus, en permettant une réalimentation rapide de l'organisme en virus circulants après l'arrêt de traitement.

La notion de réservoir peut être envisagée à deux niveaux, au niveau cellulaire, de par la capacité du virus à infecter les cellules de façon latente ; et au niveau tissulaire, en raison de sites anatomiques isolés du reste de l'organisme.

3-1- Les réservoirs cellulaires

Deux catégories de latence du HIV ont été décrites, suivant si le virus a intégré ou non le génome de la cellule hôte. Ce sont les latences pré-intégrative et post-intégrative (figure 15).

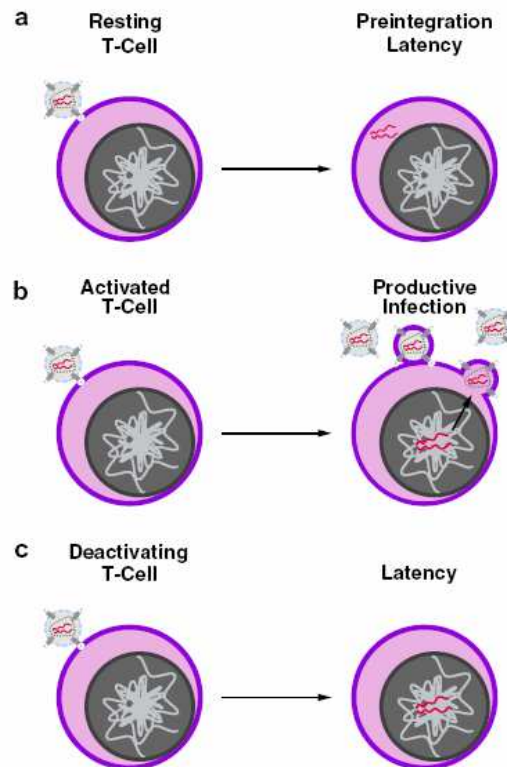


Figure 15 : L'état d'activation des lymphocytes T influence l'état de latence du VIH (latence pré- ou post-intégrative)

- (a) Infection des lymphocytes T inactivés : Latence pré-intégrative, le provirus labile reste dans le cytoplasme et ne s'intègre pas
- (b) Infection des lymphocytes T activés : Intégration du provirus dans le génome de la cellule hôte et infection active avec production de nouveaux virions
- (c) Infection de lymphocytes T en attente d'activation : Latence post-intégrative, reverse transcription et intégration du provirus, mais pas d'expression des gènes viraux

(D'après Williams et Greene, 2007)

La latence pré-intégrative est en général observée dans les cellules quiescentes, inactivées (Zack *et al.*, 1990). Cet état latent est caractérisé par une transcription inverse incomplète, conséquence du nombre insuffisant de nucléotides dans ces cellules (Zack *et al.*, 1990 ; Zack *et al.*, 1992 ; Stevenson *et al.*, 1990), de l'activité de la désoxycytidine désaminase antirétrovirale, APOBEC3G (sous sa forme à faible masse moléculaire) (Chiu *et al.*, 2005), ainsi que du manque d'ATP nécessaire à l'entrée du provirus dans le noyau (Chiu *et al.*, 2005 ; Bukrinsky *et al.*, 1991). Cependant, de par sa nature labile, la latence pré-intégrative n'apparaît pas aussi importante du point de vue clinique que la latence post-intégrative. La demi-vie de cet ARN viral rétro-transcrit incomplet est d'environ un jour (Zhou *et al.*, 2005). Ainsi les lymphocytes T quiescents peuvent servir de réservoir viral latent en maintenant le virus sous une forme pré-intégrative jusqu'à leur activation.

Les mécanismes de latence post-intégrative sont moins clairs. Dans ce cas, la latence se définit comme un état transcriptionnel du provirus intégré. Probablement dû à son état défectueux, le provirus est à

l'état quiescent quelque soit l'état d'activation de la cellule, il s'agit de la latence absolue (Butera, 2000). Cependant, dans certains cas, le provirus intégré est seulement considéré comme « dormant » du point de vue transcriptionnel, jusqu'à ce que la cellule soit activée (Folks *et al.*, 1987 ; Clouse *et al.*, 1989). Cet état est alors appelé latence microbiologique. Après activation virale, le cycle se termine par la production de nouveaux virions. C'est cette forme de latence qui constitue un obstacle à l'éradication du virus et qui est au premier plan des recherches cliniques et thérapeutiques.

Les lymphocytes CD4⁺ mémoires sont considérés comme le principal réservoir de virus dans l'organisme (Blankson *et al.*, 2002 ; Finzi et Siliciano, 1998). La demi-vie de ces cellules est longue (44 mois) (Noë *et al.*, 2005). Ce sont des cellules quiescentes T CD4⁺, comprenant un virus fonctionnel (compétent pour la réplication, Chun et Fauci, 1999), ce qui correspond à seulement 10³ à 10⁷ cellules dans l'organisme (Chun *et al.*, 1997). La latence virale dans les cellules quiescentes s'établit très tôt lors de l'infection à VIH, pendant la primo-infection, quand la virémie et le taux de lymphocytes CD4⁺ activés sont nombreux (Chun *et al.*, 1998).

Certaines études ont montré que les macrophages sont une cible de la réplication virale, et donc un réservoir important du VIH. Ces données se sont basées sur les connaissances des autres infections à lentivirus (Gendelman *et al.*, 1985 ; Meltzer et Gendelman, 1992). Le fait que les macrophages dérivés de monocytes et les macrophages tissulaires puissent être infectés *in vitro*, qu'ils aient une longue espérance de vie et qu'ils ne soient pas sensibles aux effets cytopathiques du VIH-1, supporte l'idée de leur rôle de réservoir viral (Crowe et Sonza, 2000).

Dans le cerveau, la microglie qui exprime à la fois CCR5 et CCR3, peut être infectée par le VIH-1 et a une longue demi-vie (Ghorpade *et al.*, 1998). D'autres cellules à longue demi-vie comme les cellules dendritiques peuvent aussi être infectées et servir de réservoir viral (Hanly et Petito, 1998). Elles participent à la réplication virale de deux manières : par infection directe et production de virus mais aussi par la captation à la surface de leur membrane de virus qu'elles pourront relâcher et transmettre par la suite aux lymphocytes T CD4⁺. Elles sont présentes dans les organes lymphoïdes comme la rate et les ganglions lymphatiques.

Les macrophages et les cellules dendritiques jouent donc plutôt un rôle dans la diffusion du virus. Elles relâchent des particules virales et favorisent ainsi une transmission de cellules à cellules au sein de différents organes en fonction de leur localisation.

Les lymphocytes T CD4⁺ sont, eux, responsables du maintien à très long terme du virus au sein du patient.

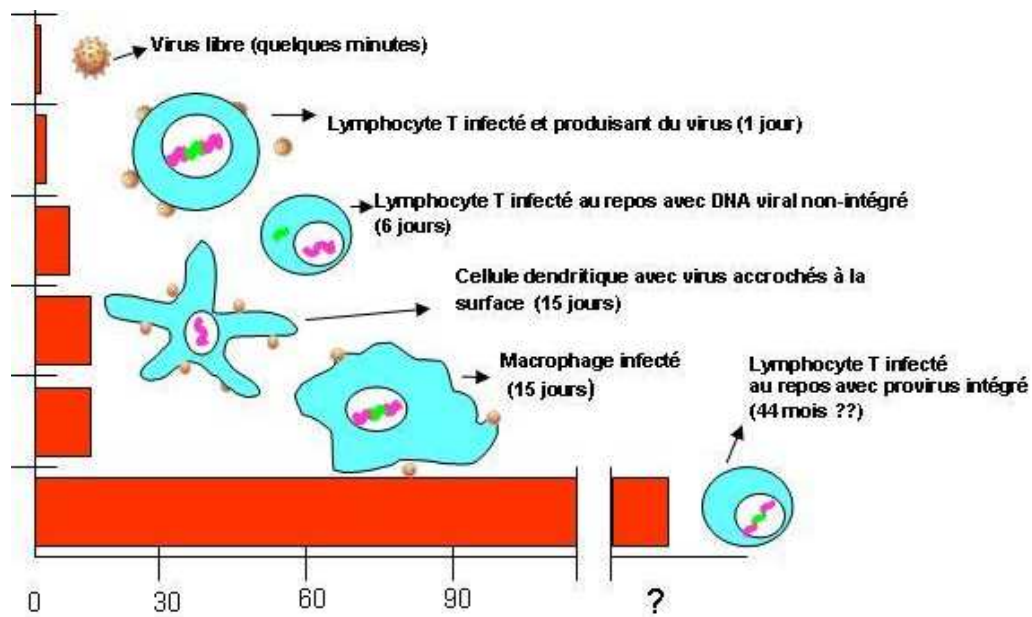


Figure 16 : Temps de demi-vie des différents réservoirs cellulaires (jours).

3-2- Les réservoirs anatomiques

Les sanctuaires anatomiques sont des réservoirs d'agents pathogènes qui se révèlent peu accessibles aux substances anti-infectieuses. Ces compartiments profonds correspondent aux organes protégés de la circulation systémique par des barrières physiologiques, comme le cerveau et l'appareil génital mâle, voire le système lymphoïde (Shrager et D'Souza, 1998). Les ganglions lymphatiques jouent un rôle essentiel dans la pathogénèse du VIH-1 (Cavert *et al.*, 1997 ; Tenner-Racz *et al.*, 1998) et fournissent un environnement propice à la réplication virale (Rieckmann *et al.*, 1991). Le tractus génital mâle est considéré comme réservoir viral, de part le manque de corrélation de la charge virale, du génotype et du phénotype des souches virales entre la circulation sanguine et le liquide séminal (Coombs *et al.*, 1998).

D'autres organes comme les glandes salivaires, la prostate, le rein ont aussi bénéficié du qualificatif de réservoir mais les arguments avancés pour affirmer qu'il existe, dans ces sites, une population virale autonome, distincte de celle présente dans la circulation générale, ont été contestés (Smith *et al.*, 2004 ; Winston *et al.*, 2001).

Nous allons nous attarder un peu plus sur le système nerveux central, réservoir anatomique séparé de la circulation systémique par la barrière hémato-encéphalique.

3-3- Le système nerveux central (SNC) et la barrière hémato-encéphalique (BHE)

3-3-1- Historique des recherches

Les connaissances actuelles sur la barrière hémato-encéphalique sont le résultat de 120 ans de recherche intense (figure 17). Les premières expériences reviennent à Paul Ehrlich, qui en 1885, observa que des sondes hydrophiles injectées dans la circulation périphérique ne coloraient pas le cerveau. Ehrlich interpréta ces résultats comme un manque d'affinité de la sonde pour le système nerveux central. Par la suite, les travaux d'Edwin E. Goldman ont montré qu'en injectant ces colorants directement dans le liquide céphalo-rachidien, seul le cerveau était coloré. Le concept de barrière hémato-encéphalique vasculaire était né, et c'est Lewandowsky qui lui donna son nom en 1900. Pendant des années, cette barrière a été sujet à controverse et ce n'est qu'en 1967, que la microscopie électronique a permis de démontrer que c'est l'endothélium des capillaires cérébraux qui constitue la BHE (Reese et Karnovsky, 1967 ; Brightman et Reese, 1969). En 1969, Siakotos *et al.* ont réussi à isoler des capillaires cérébraux (Siakotos et Rouser., 1969). Betz *et al.* ont, eux, isolé des cellules endothéliales de capillaires cérébraux et ont réussi à créer un modèle *in vitro* de barrière hémato-encéphalique (Betz *et al.*, 1980). Depuis, de nombreux modèles *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro* ont été utilisés en recherche fondamentale et en criblage industriel de médicaments, principalement dans le but d'augmenter la délivrance de médicaments au cerveau (Abbott *et al.*, 1992 ; Pardridge *et al.*, 1990 ; Miller *et al.*, 2000 ; Mégard *et al.*, 2002 ; Josserand *et al.*, 2006). La compréhension des mécanismes moléculaires du développement de la BHE, de sa fonction et de sa régulation, ont fait l'objet de nombreuses recherches (Grant *et al.*, 1998 ; Risau et Wolburg, 1990 ; Staddon *et al.*, 1995). Cependant, même aujourd'hui, à l'aire de la génomique et de la protéomique, franchir la BHE pour traiter les maladies du système nerveux central, reste un défi.

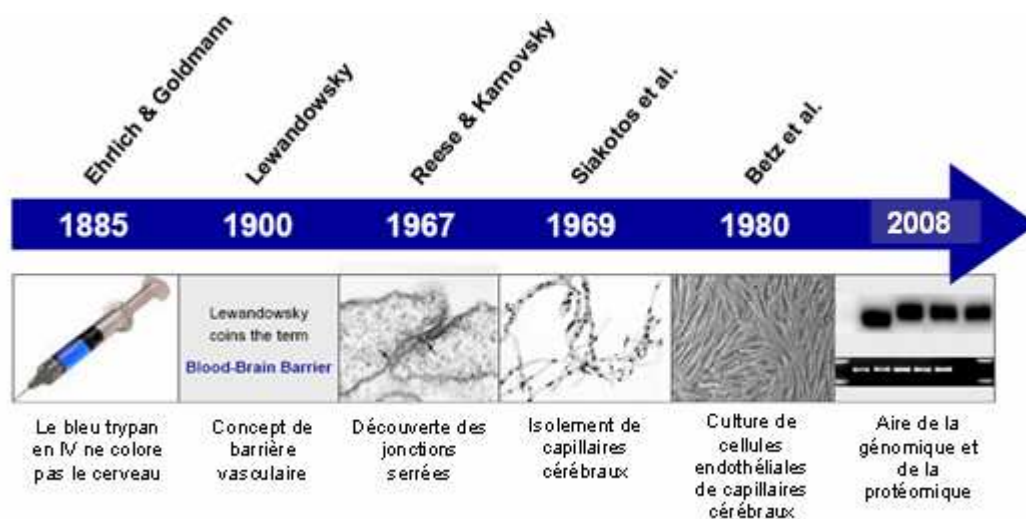


Figure 17 : Historique des recherches sur la barrière hémato-encéphalique (Anita HARTZ, 2005)

3-3-2- Fonction physiologique

La BHE est un endothélium de capillaire cérébral entre le sang et le cerveau. Ses fonctions principales sont de protéger le cerveau et de maintenir l'homéostasie cérébrale. Elle prévient l'entrée dans le cerveau de composés endogènes ou exogènes potentiellement neurotoxiques, incluant un grand nombre de médicaments contre les maladies du SNC (Banks, 1999). Cependant, ce n'est pas seulement une barrière physique et mécanique, c'est aussi une interface hautement active, dynamique et sélective. Elle régule les échanges de composés entre le sang et le cerveau (Begley et Brightman, 2003). Par exemple, elle permet d'approvisionner le cerveau en glucose, acides aminés et autres nutriments, et en même temps d'en éliminer les déchets métaboliques. En contrôlant les échanges entre le sang et le SNC, la BHE assure également le maintien de l'homéostasie cérébrale (pression osmotique constante), indispensable au bon fonctionnement des neurones (Drewes, 1999). En effet, les transmissions synaptiques entre les neurones nécessitent un milieu extracellulaire exceptionnellement stable. Toutes ces caractéristiques font de la BHE à la fois un organe extrêmement complexe, et un sujet de recherche passionnant.

3-3-3- Un réseau microvasculaire

Les capillaires cérébraux (microvaisseaux) sont la base structurale de la BHE. Avec un diamètre de 3 à 7 μm , ce sont les plus petits vaisseaux du système vasculaire (figure 18-C) (Rodriguez-Baeza *et al.*, 2003). La BHE humaine comprend environ 100 milliards de capillaires formant un énorme réseau microvasculaire (figure 18-A). De part la haute densité vasculaire du cerveau, les capillaires isolés ne sont qu'à une distance de 40 μm les uns des autres, distance permettant à de petites molécules de diffuser en une seconde (figure 18-B). De plus, ceci assure que chaque neurone soit alimenté par son propre capillaire. Malgré ce nombre élevé de capillaires, ils n'occupent que 0.1% du volume cérébral, soit 1 ml dans un cerveau adulte de 1200 à 1400 g (Pardridge, 2003).

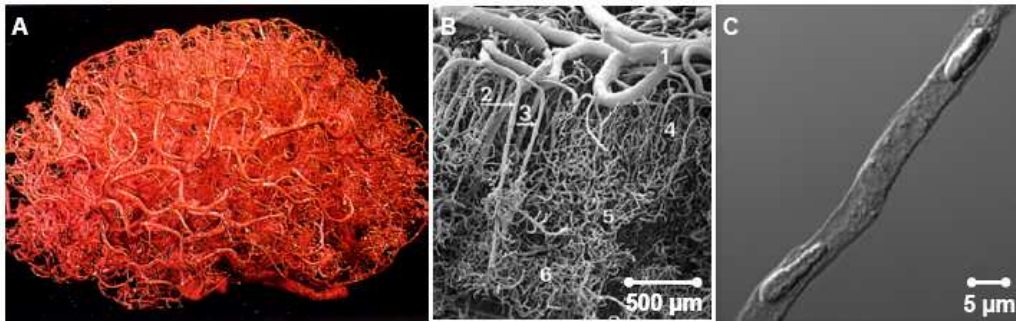


Figure 18 : Microvaisseaux cérébraux

- A- Moule en latex du réseau microvasculaire d'un cerveau humain adulte (Zlokovic et Apuzzo, 1998)
- B- Cortex cérébral humain en microscopie électronique (Rodriguez-Baeza *et al.*, 2003) : (1) vaisseau ; (2) grosse artère ; (3) artère moyenne ; (4) zone capillaire superficielle ; (5) zone capillaire moyenne ; (6) zone capillaire profonde
- C- Capillaire isolé de cerveau de rat en imagerie à contraste de phase

3-3-4- Morphologie des capillaires cérébraux

Les microvaisseaux cérébraux de la BHE sont constitués de cellules endothéliales. Ce sont des cellules polarisées, avec une membrane apicale (luminale) du côté du sang et une membrane baso-latérale (abluminale) du côté du cerveau (Betz *et al.*, 1980). Morphologiquement, ce sont des cellules à la fois longues et fuselées, mais aussi plates et minces avec seulement 300 nm d'espace cytoplasmique entre les membranes luminale et abluminale (Pardridge, 2003). Elles sont entourées d'une membrane basale composée de collagène et de protéines, qui apporte un support externe (Goldstein et Betz, 1983). A la base de cette membrane, des péricytes, des astrocytes et des neurones sont en contact avec les cellules endothéliales (figure 19). Aujourd'hui, c'est l'ensemble de ces 4 cellules, appelé « unité neurovasculaire », qui est responsable de la régulation du flux sanguin et de la fonction de barrière (Begley, 2004). Les cellules endothéliales cérébrales sont étroitement liées entre elles par des complexes jonctionnels, composés de jonctions serrées et de jonctions adhérentes. Ces complexes scellent l'espace inter-endothélial et créent un endothélium imperméable qui restreint les échanges de solutés par diffusion libre (Nag, 2003). De plus, ces cellules endothéliales montrent une faible activité de pinocytose et ne présente pas de fissure intercellulaire. Cependant, elles contiennent un nombre important de mitochondries afin de fournir l'énergie nécessaire à des processus actifs, tels que le métabolisme ou l'efflux ATP-dépendant (Goldstein et Betz, 1983).

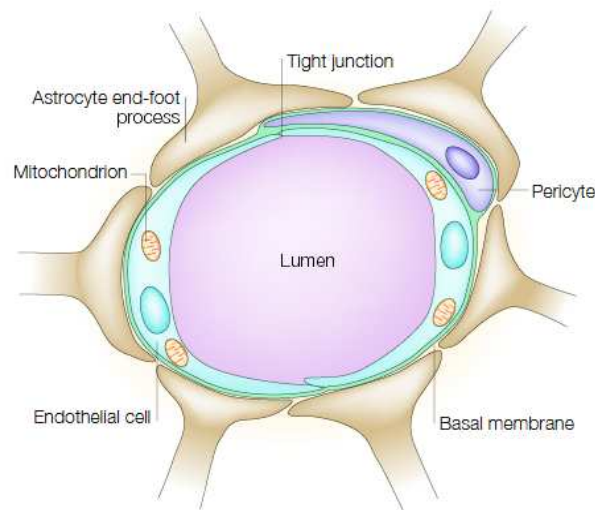


Figure 19 : Morphologie des capillaires cérébraux
Les cellules endothéliales sont entourées d'une membrane basale, de pieds astrocytaires et de péricytes. L'espace inter-endothélial est scellé par des jonctions serrées.

3-3-5- Les complexes jonctionnels

Les jonctions serrées

Depuis la fin des années 60, les jonctions serrées ont été identifiées comme un élément crucial de la fonction de la BHE (Reese et Karnovsky, 1967 ; Brightman et Reese, 1969). Elles sont localisées dans la partie apicale de la membrane plasmique des cellules. Elles scellent l'espace entre deux cellules endothéliales adjacentes, et donc empêchent la diffusion paracellulaire et permettent seulement le passage de l'eau, d'ions et de molécules de taille inférieure à 0.2 nm. Elles sont composées d'une combinaison de protéines transmembranaires et cytoplasmiques reliées au cytosquelette d'actine (figure 20).

Au moins 3 types de protéines transmembranaires seraient présents au niveau des jonctions serrées : l'occludine, les claudines et les molécules jonctionnelles d'adhésion (JAMs).

L'occludine (la première à avoir été isolée, Furuse *et al.*, 1993) est une protéine de 60 kDa à 4 segments transmembranaires dont les 2 extrémités sont intracellulaires (Balda *et al.*, 2000). Contrairement aux jonctions serrées des tissus périphériques, l'occludine est retrouvée à de fortes concentrations dans la BHE (Hirase *et al.*, 1997). Elles semblent avoir un rôle dans la résistance électrique de la BHE et dans la fonctionnalité des jonctions serrées (Tsukita et Furuse, 2000).

Les claudines, elles, semblent avoir un rôle important dans la formation des jonctions serrées. La claudine-5 serait la principale claudine exprimée au niveau de la BHE (Morita *et al.*, 1999). Il s'agit de

petites protéines de 20 kDa, qui possèdent 4 segments transmembranaires. Elles s'organisent en dimères et se lient aux claudines homotypiques des cellules adjacentes.

Les domaines extracellulaires des claudines et de l'occludine constitueraient une première barrière à la diffusion paracellulaire, en s'organisant en pores aqueux de perméabilité variable (Tsukita *et al.*, 2001).

Les JAMs appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. Ce sont des protéines de 40 kDa constituées d'un segment transmembranaire et de 2 boucles immunoglobuline-like dans leur domaine extracellulaire. Les JAMs sont impliquées dans l'adhésion cellule-cellule et contribuent à la régulation de la perméabilité ainsi qu'à l'extravasation des monocytes (Martin-Padura *et al.*, 1998).

Les protéines cytoplasmiques auxiliaires incluent les protéines de la Zonula Occludens (ZO 1, 2 et 3) qui forment la plaque submembranaire des jonctions serrées. Ces trois protéines appartiennent à la famille des MAGUKs (membrane-associated guanylate kinase) qui sont impliquées dans la transduction de signaux (Anderson, 1996). Elles sont reliées aux extrémités C-terminales des claudines et de l'occludine (Itoh *et al.*, 1999 ; Petty et Lo, 2002). Le cytosquelette d'actine est relié aux extrémités C-terminales de ZO-1 et ZO-2 (Itoh *et al.*, 1999).

La 7H6 est une phosphoprotéine de 155 kDa qui pourrait participer au contrôle de la perméabilité paracellulaire.

La cinguline, une phosphoprotéine de 140 à 160 kDa, est aussi localisée à la face cytoplasmique des jonctions serrées. Elle servirait de lien entre la plaque protéique et le cytosquelette.

Les protéines de régulation incluent les protéines G, les aPKC (atypical isoforms of protein kinase C), la symplektine, qui sont impliquées dans la signalisation en provenance et vers les jonctions serrées (Matter et Balda, 2003 ; Wolburg et Lippoldt, 2002).

D'une part, la composition et la structure du complexe jonctionnel garantissent une barrière étroite, mais ce complexe permet également une régulation rapide des propriétés de la barrière qui maintient l'intégrité structurale et donc la protection du SNC (Kniesel et Wolburg, 2000). Cependant, dans des conditions pathologiques, les jonctions serrées peuvent être perturbées, menant alors à de sévères dommages cérébraux et une perte de fonction neuronale (Huber *et al.*, 2001).

Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes forment une ceinture continue qui permet le maintien des cellules voisines les unes aux autres. Elles sont composées de glycoprotéines transmembranaires de la superfamille des cadhérines qui sont des récepteurs Ca^{2+} -dépendants formant des complexes homotypiques avec les cellules adjacentes (Steinberg et McNutt, 1999). Ces glycoprotéines sont reliées au cytosquelette par des protéines d'ancrage cytoplasmiques : la β -caténine, la γ -caténine et la p120^{cas} qui appartiennent à

la famille des protéines Armadillo (McCrea *et al.*, 1991). Les β et γ -caténines sont reliées à l' α -caténine qui est elle-même liée au cytosquelette d'actine (Provost et Rimm, 1999). La (VE)-cadhérine et la PECAM-1 (Placental endothelial cell adhesion molecule-1) ont également été détectées au niveau des jonctions adhérentes (Dejana, 1996 ; Matsumura *et al.*, 1997). En plus de leur rôle dans l'adhésion cellule-cellule, les caténines ont un rôle crucial dans la signalisation intracellulaire.

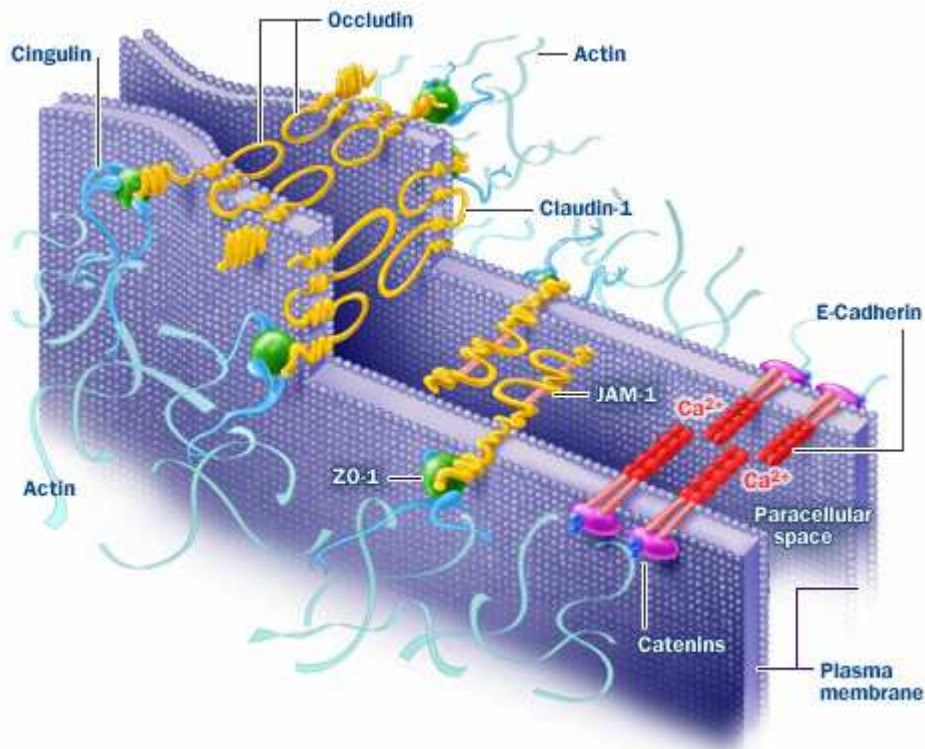


Figure 20 : Les complexes jonctionnels au niveau de la barrière hémato-encéphalique : jonctions serrées (jaune) et jonctions adhérentes (rouge) (Source : www.nastech.com)

3-3-6- Système nerveux central et infection à VIH

Neuro-invasion par le VIH

En dépit de recherches très actives sur ces mécanismes de neuro-invasion, la voie initiale d'entrée du virus dans le SNC reste énigmatique et fortement controversée. L'infection du SNC par le VIH a lieu très tôt après la primo-infection. Les virus isolés dans le cerveau des patients sont donc majoritairement des souches à tropisme macrophagique (Sharpless *et al.*, 1992). Une fois dans le cerveau, le virus pourrait s'y maintenir pendant plusieurs années, d'où son rôle de réservoir viral (Musey *et al.*, 1997).

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer l'entrée du VIH dans le SNC (figure 21). L'hypothèse du cheval de Troie est la plus probable. Elle suggère que le VIH puisse entrer dans le cerveau par infiltration de cellules immunitaires infectées. Ce mécanisme a déjà été décrit pour l'invasion par d'autres lentivirus et par le virus HTLV-1 (human T-cell leukemia virus type 1) (Georgsson, 1994 ; Romero *et al*, 2000). Diverses cellules immunitaires périphériques telles que les monocytes et les lymphocytes pourraient traverser la BHE (Miller, 1999) ; en particulier des monocytes infectés ont été proposés comme pouvant migrer dans le SNC (Gartner, 2000). Lorsque la BHE présente une brèche des jonctions serrées, la migration de monocytes infectés dans le SNC augmente (Dallasta *et al.*, 1999). Cette rupture pourrait être causée par des substances toxiques directement sécrétés par les monocytes infectés, telles que des cytokines, de la prostaglandine, de l'oxyde nitrique (Bukrinsky *et al.*, 1995 ; Eugenin *et al.*, 2006); ou bien par liaison de la gp120 à la surface des cellules endothéliales (Kanmogne *et al.*, 2005).

La seconde hypothèse est celle du passage libre de virus dans le cerveau. Le VIH pourrait migrer dans les cellules endothéliales (voie paracellulaire), ou bien être transporté dans des vacuoles à l'intérieur des cellules endothéliales (transcytose). La transmigration du VIH a été démontré *in vitro* dans des cultures primaires de cellules endothéliales (Bobardt *et al.*, 2004) et dans des microvésicules de cerveau, isolées de souris (Banks *et al.*, 2004). Diverses études sur cellules en culture suggèrent que les particules virales pénétreraient dans les cellules endothéliales par endocytose adsorptive, induite par la gp120 (Banks *et al.*, 1998). Cependant la majorité des virus entrant dans les cellules endothéliales est lysée dans les lysosomes et moins de 1% traverserait de cette façon (Bobardt *et al.*, 2004 ; Liu *et al.*, 2002).

La dernière hypothèse est celle de la transmission du virus par les cellules endothéliales infectées et produisant des virus. Un nombre limité d'études ont montré que le VIH-1 pouvait infecté les cellules de la BHE dans certaines conditions (Rostad *et al.*, 1987 ; Ward *et al*, 1987 ; Wiley *et al.*, 1986 ; Wiley et Nelson, 1988 ; An *et al.*, 1999 ; Bagasra *et al.*, 1996).

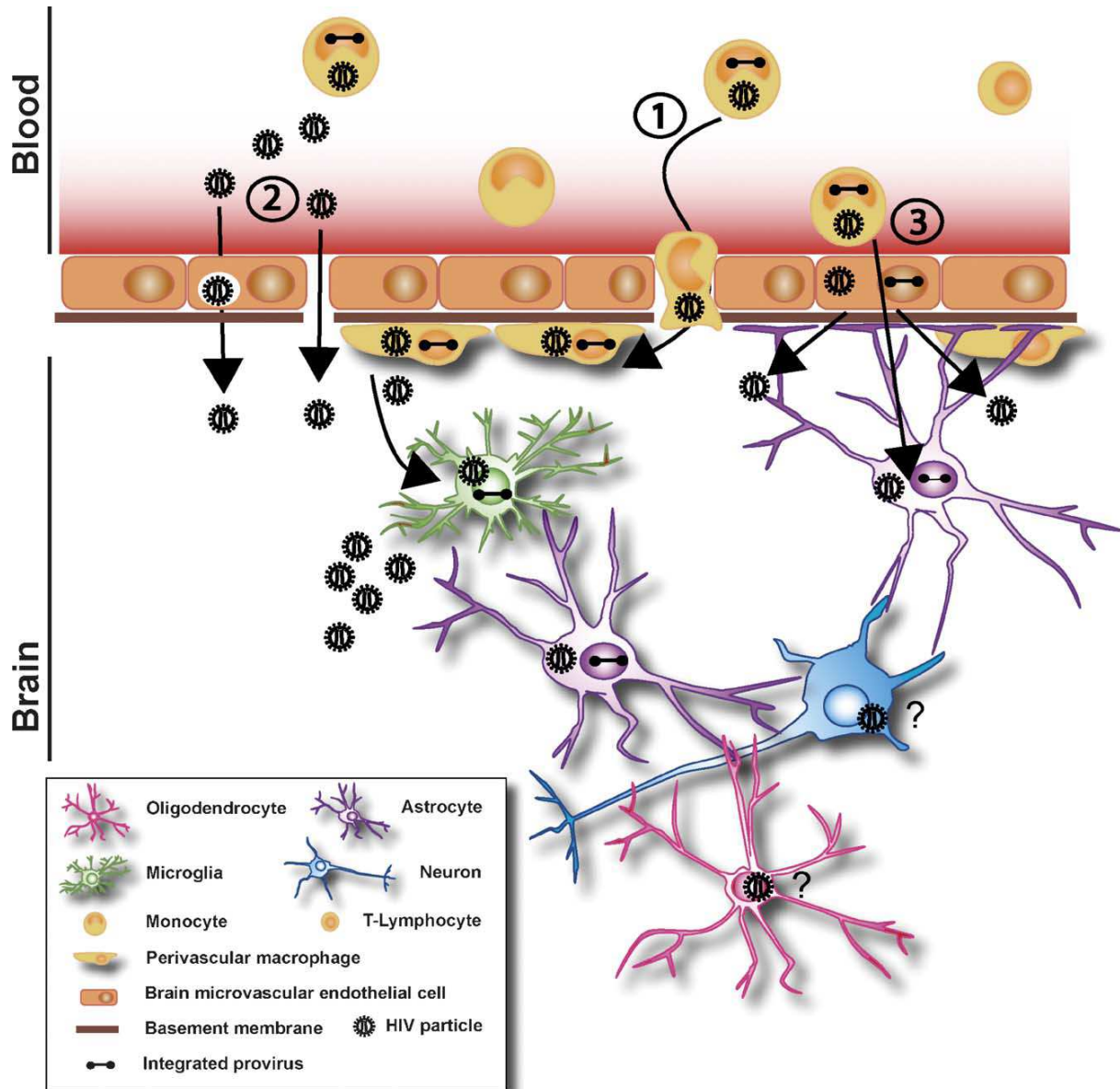


Figure 21 : Mécanisme d'invasion du SNC par le VIH (Kramer-Hämmerle *et al.*, 2005)

Trois voies d'entrée du VIH dans le SNC ont été proposées. L'hypothèse la plus probable est (1) la migration de cellules infectées, principalement des monocytes du sang vers le cerveau (hypothèse du cheval de Troie). Les autres voies proposées sont (2) le passage de virus libres dans le cerveau par migration entre les cellules endothéliales ou bien par transcytose à travers ces cellules ; et (3) la libération de virus dans le cerveau par des cellules endothéliales infectées. Les virus libérés par des macrophages périvasculaires infectés contribuent à l'infection de la microglie et occasionnent une diffusion du virus dans le parenchyme cérébral. L'infection des astrocytes pourrait survenir au niveau de la BHE ou du parenchyme cérébral, par contact avec des virus libres ou bien des cellules infectées. L'infection des neurones et des oligodendrocytes est très controversée (indiquée ? sur le schéma)

Infection par le VIH des cellules du parenchyme cérébral

La microglie et les macrophages sont les principales cellules productrices de virus dans le cerveau (Anderson *et al.*, 2002-b ; Kaul *et al.*, 2001). Elles seraient sensibles à l'effet cytopathogène induit par l'infection virale (Watkins *et al.*, 1990). Les cellules géantes caractéristiques de l'encéphalopathie à VIH-1 proviennent de la fusion de microglie infectée (Dickson, 1986).

L'infection des astrocytes a suscité de nombreuses controverses. Depuis, de nombreuses études ont montré que le VIH pouvait infecter les astrocytes de façon peu productive (Kramer-Hammerle *et al.*, 2005). Les corécepteurs CCR5 et CXCR4 seraient présents sur ces cellules mais pas le récepteur CD4. L'entrée du virus serait donc indépendante de ce récepteur. D'autres récepteurs dont celui du mannose ont été mis en évidence comme ayant une affinité pour le virus (Liu *et al.*, 2004).

Le mécanisme d'entrée du VIH dans les oligodendrocytes est mal connu. Ils n'expriment pas le récepteur CD4, mais possèdent le récepteur galactosyl-ceramide qui est décrit comme médiant l'infection des astrocytes par le VIH (Harouse *et al.*, 1991). Cependant leur infection n'est pas bloquée par des anticorps anti-galactosyl-ceramide (Albright *et al.*, 1996).

L'infection de neurones *in vivo* a été reportée par quelques études utilisant la PCR, *in situ* (Nuovo *et al.*, 1994 ; Bagasra *et al.*, 1996) ou sur des neurones isolés par microdissection au laser (Torres-Munoz *et al.*, 2001 ; Trillo-Pazos *et al.*, 2003). Cependant d'autres rapports ont échoué à identifier de l'ADN viral (An *et al.*, 1996 ; Takahashi *et al.*, 1996) ou des protéines structurales du VIH (Wiley *et al.*, 1999) *in vivo* dans les neurones. L'infection directe des neurones par le VIH est donc toujours sujette à controverse. Si les neurones sont infectés, il ne semble pas que le virus se réplique. Les neurones humains n'expriment pas de récepteur CD4 (Ensoli *et al.*, 1995 ; Li *et al.*, 1990) et les anticorps anti-CD4 ne bloquent pas l'infection de lignées neuronales (Alvarez Losada *et al.*, 2002).

3-3-7- Problèmes neurologiques associés à l'infection à VIH

Cette atteinte neurologique est, d'un point de vue clinique, l'une des complications les plus graves qui puisse survenir au cours de la maladie. Elle peut se traduire par de multiples désordres neurologiques tels que des polyneuropathies, des myélopathies ou encore l'encéphalopathie à VIH, également nommée complexe de démence associé au SIDA (ADC) (Poland *et al.*, 1995). Et, il semble que 60% des patients sidéens développent un ADC.

Cliniquement, cette encéphalopathie se caractérise par des dommages de la fonction cognitive usuellement suivis par des anomalies motrices. Sa progression peut être douce ou fulminante. Dans la plupart des cas, elle révèle des atrophies cérébrales, une raréfaction focale, des nodules microgliaux, ou la formation de cellules géantes multinucléées (Figure 22).

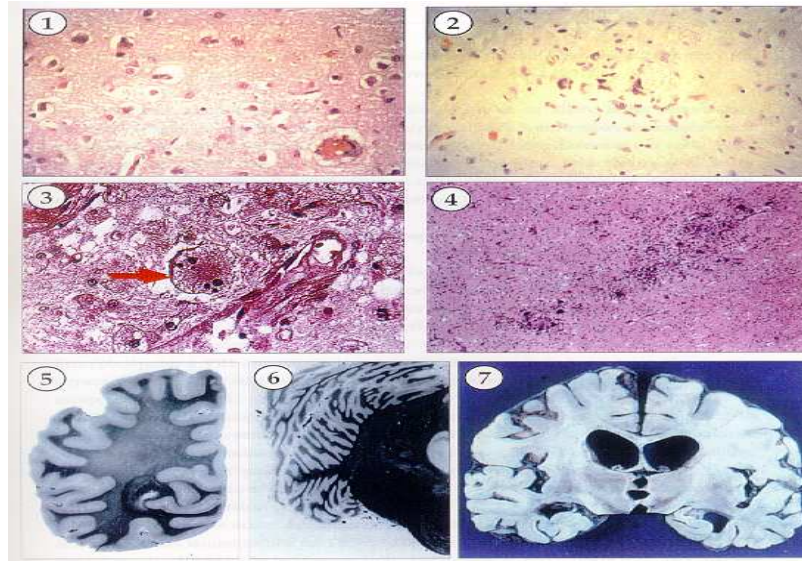


Figure 22 : Immunopathogénèse de l'encéphalopathie à VIH : (1) astroglie, (2) microglie, (3) cellules géantes multinucléées, (4) infiltration de cellules phagocytaires, (5)(6) perte neuronale, (7) atrophie cérébrale

3-3-8- Passage des antirétroviraux à travers la BHE

L'apparition des thérapies antirétrovirales hautement actives (HAART) a permis de diminuer l'incidence des démences associées au SIDA de 50%. Cependant, la fréquence des encéphalopathies et des neuropathologies détectées dans les tissus post-mortem reste inchangée, ce qui indique que les stratégies thérapeutiques actuellement utilisées n'ont pas d'effet sur les conséquences neurologiques de l'infection par le VIH, probablement du fait de l'existence de la BHE. Le passage des antirétroviraux dans le SNC va essentiellement dépendre de leur capacité à traverser cette barrière (Groothuis et Levy, 1997). Leur transport est conditionné par leurs propriétés physico-chimiques, et leur prise en charge par les transporteurs d'efflux et d'influx présents à la surface de l'endothélium (voir chapitre 3).

Les inhibiteurs nucléosidiques / nucléotidiques de la transcriptase inverse

Les INTIs et les INtTIs sont des molécules de nature voisine et possèdent des caractéristiques physico-chimiques communes. Ils ont tous un faible et équivalent poids moléculaire, ce qui favorise leur diffusion au travers des membranes. Ils sont généralement hydrophiles, ce qui d'une part, limite leur passage transmembranaire, mais qui d'autre part, est associé à une importante fraction libre (seule à pouvoir quitter le compartiment sanguin). Ainsi le principal facteur physico-chimique limitant ce passage, est le coefficient de partage, variable selon les molécules.

Les données tendent à démontrer que l’AZT, la ddI, le 3TC, la d4T, le ddC et l’abacavir ont une distribution cérébrale limitée résultant d’un efflux actif par des transporteurs sensibles au probenecide (Takasawa *et al.*, 1997-a ; Takasawa *et al.*, 1997-b ; Wu *et al.*, 1998 ; Gibbs *et al.*, 2003 ; Thomas *et al.*, 2001). Ces transporteurs sont probablement des transporteurs d’anions organiques, tels que les MRPs (Multidrug Resistance-associated Proteins), les OATPs (Organic Anion Transporting Polypeptides) ou les OATs (Organic Anion Transporters) (Takasawa *et al.*, 1997-a ; Kusuvara et Sugiyama, 2001 ; Sawchuk et Yang, 1999). L’efflux de l’AZT et de la ddI serait essentiellement dû aux transporteurs exprimés au niveau de la BHE (Takasawa *et al.*, 1997-a), alors que la distribution cérébrale de la ddC serait limitée par des systèmes d’efflux exprimés au niveau de la BHE et des plexus choroïdes (Gibbs et Thomas, 2002).

La d4T pénétrerait de façon plus efficace dans le cerveau que l’AZT (Thomas et Segal, 1998 ; Yang *et al.*, 1997). L’abacavir et la lamivudine montrent une meilleure activité antivirale que l’AZT, la ddI et la d4T, dans des cerveaux de souris SCID ayant développé une encéphalopathie à VIH-1 (Limoges *et al.*, 2000).

Les données concernant l’accumulation cérébrale de l’emtricitabine (FTC) sont limitées. Chez le primate, le taux d’accumulation dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) est de l’ordre de 10% par rapport à la concentration plasmatique (Schinazi *et al.*, 1992). Chez le rat, le taux d’accumulation dans le SNC par rapport au plasma est inférieur à 7% (Frick *et al.*, 1993).

En ce qui concerne le ténofovir, chez le cobaye, son accumulation cérébrale semble très faible (de l’ordre de 3% en 4 heures). Cependant, il semble traverser la barrière du plexus choroïde. Ce transport ne semble pas dépendant de la famille des transporteurs d’anions organiques (MRP et OATP) (Anthonypillai *et al.*, 2006).

Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse

La pénétration des INNTIs dans le SNC est assez peu documentée. Une étude *in vitro*, réalisée sur un modèle de BHE bovin, montre que la névirapine a une meilleure perméabilité cérébrale que les INTIs et certains IPs (indinavir et saquinavir), à la différence de la delavirdine qui ne semble pas passer la BHE (Glynn et Yazdanian, 1998 ; Chang *et al.*, 1997). Chez le cobaye, le passage cérébral de la névirapine atteint presque 60% par rapport aux concentrations plasmatiques (Gibbs *et al.*, 2006).

De plus, la névirapine et l’efavirenz semblent pénétrer dans les plexus choroïdes (Thomas, 2004).

Les inhibiteurs de la protéase

Les IPs font partie des molécules dont la perméabilité à travers la BHE est inférieure à celle attendue du fait de leur lipophilie (Williams et Sinko, 1999). En effet, ces molécules ont des poids moléculaires supérieurs à 600 g/mol, des coefficients de partition (log P) supérieurs à 1,3 ; et elles sont fortement liées aux protéines plasmatiques. De plus, la majorité des IPs actuellement utilisés ont été décrits

comme substrats d'un ou plusieurs transporteurs d'efflux présents au niveau de la BHE [notamment la P-glycoprotéine (Pgp) et les MRPs].

Les données *in vitro* suggèrent un rôle prépondérant de la Pgp dans la prise en charge des IPs au niveau de la BHE, et par conséquent dans leur distribution cérébrale (Van der Sandt *et al.*, 2001 ; Megard *et al.*, 2002 ; Ronaldson *et al.*, 2004 ; Bachmeier *et al.*, 2005).

Les expériences réalisées sur des modèles animaux « *knockout* » vont également dans le sens d'un contrôle de la pénétration cérébrale des IPs par la Pgp. Ainsi, la concentration cérébrale d'indinavir et de saquinavir est 8 à 10 fois supérieure chez les souris *mdr1*^{-/-} (*mdr1* codant pour la Pgp) que chez les souris sauvages. Il en est de même pour le nelfinavir dont la concentration dans le SNC est 40 fois supérieure (Kim *et al.*, 1998 ; Sharpless *et al.*, 1992), et pour l'amprénavir (Polli *et al.*, 1999).

Cependant, une étude de perfusion *in situ* suggère un transport par diffusion passive du ritonavir à travers la BHE et les plexus choroïdes (Anthonypillai *et al.*, 2004). Chez des patients, l'association lopinavir / ritonavir semble diminuer de 10 fois la charge virale dans le liquide céphalo-rachidien (Letendre *et al.*, 2007).

4- Les transporteurs ABC

En plus de l'apparition de souches virales résistantes, certains facteurs cellulaires comme les kinases, l'expression et la fonctionnalité des transporteurs membranaires, ou la production de facteurs solubles peuvent favoriser la réplication virale et/ou amoindrir l'effet des molécules antivirales, conduisant ainsi à l'échec des traitements ARV. Nous n'aborderons dans ce manuscrit que les phénomènes liés aux protéines d'efflux (transporteurs ABC).

Chapitre 3

Les transporteurs ABC

Le transport actif à travers les membranes biologiques est devenu un facteur non négligeable dans l'absorption, la distribution, et l'excrétion d'un nombre croissant de médicaments. Différents systèmes de transport transmembranaire sont impliqués dans la biodisponibilité des médicaments. Ils incluent des membres de la famille des « Solute Carriers », dont les transporteurs d'anions et de cations organiques (OAT, OCT, famille SLC22A), les protéines de transport d'anions organiques (OATP, famille SLC21A), les transporteurs de nucléosides (CNT, famille SLC28A), les transporteurs de monocarboxylates (MCT, famille SLC2A) ; ainsi que des membres de la famille des « ATP Binding Cassette » (Gerloff, 2004 ; Kerb, 2006). C'est à cette dernière famille que nous allons nous intéresser dans ce manuscrit.

1- Généralités et structures des transporteurs ABC

L'efficacité de nombreux médicaments dépend de leur capacité à s'accumuler dans les cellules pour atteindre leur cible et exercer leur action. Les molécules lipophiles diffusent librement à travers la membrane en l'absence de système de transport spécialisé. Les molécules hydrophiles et chargées requièrent un mécanisme de transport spécifique pour faciliter leur entrée dans les cellules. Cependant, l'accumulation intracellulaire d'une molécule va dépendre non seulement de sa capacité à entrer dans la cellule mais aussi de sa capacité à en ressortir.

En effet, il existe au niveau des membranes des mécanismes actifs d'efflux, qui limitent l'accumulation de substances potentiellement toxiques pour la cellule, et peuvent ainsi être responsables de phénomènes de résistances aux médicaments. Ces transporteurs rejettent notamment hors de la cellule certains antirétroviraux utilisés dans la thérapie anti-VIH, et plus particulièrement les inhibiteurs de protéase et certains INTIs.

Ces transporteurs d'efflux appartiennent à une superfamille de protéines, qui compte environ 50 membres, ce sont les protéines ABC « ATP binding cassette » qui ont des fonctions diverses et variées (Klein *et al.*, 1999 ; Müller, 2000). Ces protéines d'efflux comprennent principalement les transporteurs de type MDR (multidrug resistance) et MRP (multidrug resistance-associated protein).

Les protéines ABC se lient aux molécules d'ATP et utilisent cette énergie pour la translocation d'une large variété de substrats (sucres, acides aminés, ions métalliques, peptides, protéines, mais aussi un grand nombre de composés hydrophobes et de métabolites) à travers les membranes extra- et intracellulaires (celles du réticulum endoplasmique, du peroxysome ou des mitochondries).

Ces protéines appartiennent à une superfamille comprenant un large groupe de protéines, dont des transporteurs membranaires, des canaux ioniques, des récepteurs, des régulateurs de canaux, des protéases... Elles sont présentes dans un grand nombre de tissus (tableau 3).

Symboles	Autres noms	Localisation	Expression	Fonction
ABCA1	ABC1	9q31.1	ubiquitaire	Efflux du cholestérol
ABCA2	ABC2	9q34	cerveau	Résistance aux médicaments
ABCA3	ABC3, ABCC	16p13.3	poumon	
ABCA4	ABCR	1p22.1-p21	rétilne	Efflux du N-retinylidienne-PE
ABCA5		17q24	muscle, cœur, testicule	
ABCA6		17q24	foie	
ABCA7		19p13.3	rate, thymus	
ABCA8		17q24	ovaire	
ABCA9		17q24	cœur	
ABCA10		17q24	muscle, cœur	
ABCA12		2q34	estomac	
ABCA13		7p11-q11	faible dans tous les tissus	
ABCB1	PGY1, MDR	7p21	Nombreux tissus (foie, rein, BHE)	Resistance multidrogue
ABCB2	TAP1	6p21	toutes les cellules	Transport de peptides
ABCB3	TAP2	6p21	toutes les cellules	Transport de peptides
ABCB4	PGY3	7q21.1	foie	Transport de PC
ABCB5		7p14	ubiquitaire	
ABCB6	MTABC3	2q36	mitochondries	Transport du fer
ABCB7	ABC7	Xq12-q13	mitochondries	Transport de clusters Fe/S
ABCB8	MABC1	7q36	mitochondries	
ABCB9		12q24	cœur, cerveau	
ABCB10	MTABC2	1q42	mitochondries	
ABCB11	SPGP	2q24	foie	Transport du sel biliaire
ABCC1	MRP1	16p13.1	poumon, testicule, PBMC	Résistance aux médicaments
ABCC2	MRP2	10q24	foie	Efflux d'anions organiques
ABCC3	MRP3	17q21.3	poumon, intestin, foie	Résistance aux médicaments
ABCC4	MRP4	13q32	prostate	Transport de nucléosides
ABCC5	MRP5	3q27	ubiquitaire	Transport de nucléosides
ABCC6	MRP6	16p13.1	rein, foie	
CFTR	ABCC7	7q31.2	tissus exocrines	Canaux d'ions chlorure
ABCC8	SUR	11p15.1	pancréas	Récepteur à la sulfonylurée
ABCC9	SUR2	12p12.1	cœur, muscle	
ABCC10	MRP7	6p21	faible dans tous les tissus	
ABCC11		16q11-q12	faible dans tous les tissus	
ABCC12		16q11-q12	faible dans tous les tissus	
ABCD1	ALD	Xq28	peroxysomes	Régulation du transport de VLCFA
ABCD2	ALDL1, ALDR	12q11-q12	peroxysomes	
ABCD3	PXMP1, PMP70	1p22-p21	peroxysomes	
ABCD4	PMP69, P70R	14q24.3	peroxysomes	
ABCE1	OABP, RNS41	4q31	ovaire, testicule, rate	Protéine de liaison des oligoadénylates
ABCF1	ABC50	6p21.33	ubiquitaire	
ABCF2		7q36	ubiquitaire	
ABCF3		3q25	ubiquitaire	
ABCG1	ABC8, White	21q22.3	ubiquitaire	Transport du cholestérol ?
ABCG2	ABCP, MXR, BCRP	4q22	placenta, intestin	Efflux des toxines, Résistance aux médicaments
ABCG4	White2	11q23	foie	
ABCG5	White3	2p21	foie, intestin	Transport de stérols
ABCG8		2p21	foie, intestin	Transport de stérols

Tableau 5 : Liste des gènes ABC humains, localisation chromosomique et fonction (Klein *et al.*, 1999)

L'appartenance à cette famille est basée sur des homologues de séquence et de structure. Ces protéines sont également conservées entre les espèces, plusieurs orthologues de protéines humaines ont été identifiés et caractérisés chez d'autres mammifères, notamment des rongeurs. Elles sont présentes aussi bien chez les organismes eucaryotes que procaryotes, de nombreux membres de cette famille ont été initialement caractérisés chez la bactérie.

A l'heure actuelle, 48 protéines ABC ont été identifiées chez l'homme et sont divisées en 7 sous-familles (Dean *et al.*, 2001) classées de A à G. La P-glycoprotéine appartient à la sous-famille B, les MRPs (Multidrug Resistance-associated Protein) à la sous famille C et la BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) à la sous-famille G.

Ces transporteurs sont constitués de deux domaines de liaison au nucléotide (NBD) situés sur la face cytoplasmique de la membrane cellulaire (Higgins *et al.*, 1986 ; Hyde *et al.*, 1990). Ce sont des domaines hautement conservés de 200 à 250 acides aminés (30 à 50% d'identité de séquences entre les différents membres). La structure générale des transporteurs ABC comprend 12 régions hydrophobes transmembranaires, divisées en deux moitiés, chacune reliée à un domaine NBD (Figure 24). Il existe un certain nombre d'exceptions à cet arrangement. Par exemple, les MRP 1 à 3 ainsi que les MRP 6 et 7 possèdent un domaine supplémentaire composé de 5 régions transmembranaires en N-terminal. La BCRP, elle, ne contient qu'une moitié de transporteur, elle ne possède que 6 régions transmembranaires et un domaine NBD. La possibilité que la BCRP puisse agir comme un dimère a été proposée (Özvegy *et al.*, 2001).

La première boucle extracellulaire de la Pgp possède une N-glycosylation, alors que les MRP4 et 5 sont glycosylées sur la quatrième boucle extracellulaire (Schinkel et Jonker, 2003). L'extrémité N-terminal des MRPs 1, 2 et 3 est extracellulaire et présente une N-glycosylation. Des études *in vitro* basées sur la Pgp ont montré que la N-glycosylation n'était pas nécessaire à la fonction de transport de ces protéines (Schinkel *et al.*, 1993). Cependant, la N-glycosylation a probablement un rôle biologique dans la cellule, aidant la protéine à se diriger vers la membrane plasmique et à stabiliser son insertion dans celle-ci.

Le domaine NBD (*Nucleotide binding domain*) contient trois domaines conservés, les domaines Walker A et B, communs aux protéines qui lient l'ATP, ainsi qu'un troisième motif (C) « signature » localisé juste en amont du site Walker B. Ce domaine (C) est spécifique des transporteurs ABC et les distinguent des autres protéines de liaison à l'ATP.

Les domaines transmembranaires (TMD) sont, eux, fortement divergents et confèreraient donc la spécificité de substrat à chaque transporteur (Hrycyna *et al.*, 1998).

Un modèle pour la fonction de la Pgp a été proposé à partir d'analyses de la séquence de l'ADNc et d'études d'hydropathie (Bellamy, 1996).

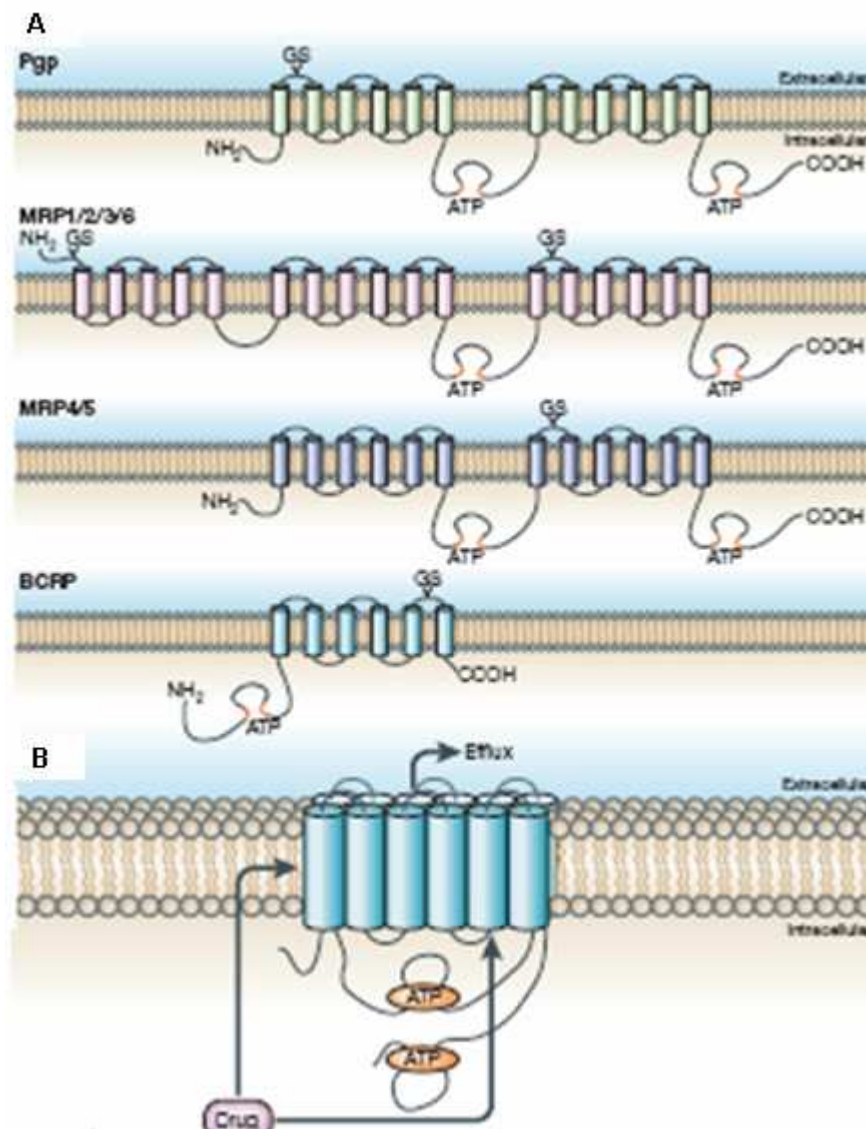


Figure 23 : Représentation schématique de l'organisation structurale transmembranaire des transporteurs ABC (Löscher et Potschka, 2005-a). A- Structure 2D des transporteurs multi-drogues. Ces modèles indiquent les segments transmembranaires, les sites de glycosylation (GS) et les sites de liaison à l'ATP. B- Représentation de la Pgp dans la membrane cellulaire. La Pgp a été décrite comme pouvant expulser les composés du cytoplasme vers le milieu extracellulaire ou pouvant médier l'efflux de composés ayant pénétrés la membrane.

Les transporteurs de type MDR et MRP sont exprimés dans la plupart des tissus de l'organisme, et plus particulièrement dans les organes responsables de l'absorption, du métabolisme et de l'excrétion des médicaments. Ainsi, ils vont pouvoir jouer un rôle essentiel dans la régulation de distribution des xénobiotiques et des médicaments et dans la détoxification cellulaire.

Le principal site d'absorption des xénobiotiques ingérés par voie orale est l'intestin grêle. A ce niveau, les entérocytes constituent une barrière sélective à leur passage, grâce à une collaboration

entre des systèmes d'efflux membranaires et des enzymes du métabolisme intracellulaire. En effet, sur la face apicale des entérocytes, sont présentes la Pgp, la MRP2 et la BCRP, alors que les MRP1 et 3 sont situées sur la face baso-latérale. Les entérocytes représentent le premier site de métabolisme des xénobiotiques ingérés par voie orale. Ils subissent tout d'abord une voie d'oxydation par les cytochromes P450 (phase I) puis une phase de conjugaison (phase II). La phase III du métabolisme des xénobiotiques est une phase de détoxification cellulaire assurée par les transporteurs ABC de type Pgp ou MRP (1, 2 ou 3) qui prennent en charge ces métabolites conjugués ou les molécules mères et les excrètent hors de la cellule.

L'absorption des médicaments au niveau de la barrière intestinale est déterminante dans leur biodisponibilité. Les médicaments qui passent cette première barrière sont acheminés vers le foie par le système porte, où ils sont métabolisés et éliminés par la voie biliaire grâce à des enzymes et des transporteurs ABC assez similaires à ceux de l'intestin. Les hépatocytes prélèvent les médicaments au niveau de leur membrane baso-latérale. Dans le milieu intracellulaire, ils peuvent être métabolisés par les enzymes présentes, puis excrétés du côté apical dans les canicules biliaires qui rejoignent l'intestin. Les molécules qui atteignent la circulation systémique sont éliminées par voie urinaire au niveau des reins qui expriment également des transporteurs ABC.

2- La sous-famille MDR : Cas de la P-glycoprotéine

Les cellules exposées à des xénobiotiques peuvent développer un phénotype de résistance multiple aux médicaments (le phénotype MDR) qui induit une insensibilité aux activités biologiques de nombreuses molécules en plus de celle du composé responsable de la sélection initiale.

Les cellules devenues MDR présentent généralement une instabilité génétique accompagnée d'un dérèglement du cycle cellulaire, ce qui complique le traitement du patient. Le phénotype MDR résulte de la surexpression de certains transporteurs ABC, et plus particulièrement celle du transporteur MDR1 ou P-glycoprotéine, considérée comme la principale cause des résistances multiples aux médicaments dans les cellules tumorales.

La Pgp fut le premier transporteur ABC identifié par Juliano et Ling en 1976. C'est donc le transporteur ayant été le plus étudié. La Pgp est codée par le gène *mdr1* chez l'homme et les gènes *mdr1a* et *mdr1b* chez les rongeurs. Le gène *mdr1* est situé sur le chromosome 7 et fut cloné et séquencé en 1986 (Fojo *et al.*, 1986 ; Roninson *et al.*, 1986).

2-1- Structure tridimensionnelle de la Pgp

La Pgp est composée de 1280 résidus amino-acides, organisés en deux unités répétées de 610 résidus reliées par une région de 60 acides aminés. Chacune de ces unités est constituée de 6 segments transmembranaires et d'un domaine hydrophile contenant le domaine de liaison à l'ATP. La liaison de l'ATP et des substrats de la Pgp s'effectue à l'interface entre ces 2 unités.

L'ATP se fixerait entre le site Walker A d'un site NBD et la séquence signature LSGGQ de l'autre site NBD (Leslie *et al.*, 2005 ; Hyde *et al.*, 1990 ; Higgins et Linton, 2004). Ainsi l'activation ou l'inhibition de l'activité ATPasique de la Pgp par certains de ses substrats serait dû à un mécanisme induisant le rapprochement ou l'éloignement de cette séquence signature.

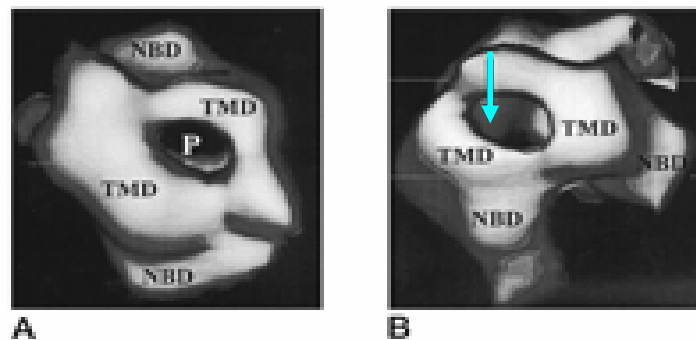


Figure 24 : Structure tridimensionnelle à basse résolution (25 Å) de la Pgp (Rosenberg *et al.*, 1997). TMD = domaines transmembranaires, NBD = domaines de liaison aux nucléotides, P = pore central, flèche bleue = pore latéral. A- Vue de dessus. B- Vue latérale.

2-2- Localisation de la Pgp

Différentes techniques ont été utilisées de manière à localiser au niveau tissulaire l'expression de la Pgp (Bosch et Croop, 1996). Des expériences utilisant des sondes spécifiques pour le dosage cellulaire d'ARNm, ont permis de révéler une expression physiologique de la Pgp variable dans les différents tissus sains humains (Fojo *et al.*, 1987). L'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques de la Pgp ont également permis de déterminer la localisation de la Pgp dans différents tissus murins et humains. Elle révèle ainsi un taux d'expression variable selon le tissu considéré (Thiebaut *et al.*, 1987). La Pgp est majoritairement exprimée au niveau du foie (surface apicale des hépatocytes constituant les canicules biliaires), du colon (surface apicale des cellules épithéliales constituant la muqueuse) et des reins (bordure en brosse des tubules proximaux). Mais la Pgp est également exprimée en plus faible quantité au niveau de la muqueuse intestinale, de la corticosurrénale, de l'endomètre de l'utérus gravide, de l'endothélium des capillaires cérébraux et testiculaires (Cordon-Cardo *et al.*, 1989); et en quantité moindre au niveau de pancréas et du poumon. La Pgp est également exprimée au niveau de

certaines cellules sanguines comme par exemple les cellules souches (Chaudhary et Roninson, 1991), les lymphocytes (Chaudhary *et al.*, 1992) et les monocytes (Gupta et Gollapudi, 1993). Chez l'homme, la proportion de cellules sanguines circulantes exprimant la Pgp varie de 20 à 80% pour les lymphocytes B et de 30 à 100% pour les lymphocytes T CD4 (Chaudhary *et al.*, 1992 ; Drach *et al.*, 1992 ; Klimecki *et al.*, 1994 ; Pilarski *et al.*, 1995).

2-3- Les substrats de la Pgp

La Pgp présente une large diversité de substrats ne présentant pas d'anaologie de structure, et dont le seul point commun semble être un fort caractère hydrophobe. C'est pour cette raison que la Pgp est qualifiée de « transporteur multispécifique ou multidroque » (Gottesman *et al.*, 1998). Il semble tout de même que les substrats de la Pgp soient préférentiellement des composés neutres ou cationiques, et possèdent souvent des noyaux aromatiques dans leur structure. Leur liste ne cesse d'augmenter et comprend des composés aussi variés que des agents anti-cancéreux, des antibiotiques, des antiviraux, des agents bloquant les canaux calciques ou des immunosuppresseurs (tableau 3).

La Pgp est également impliquée dans le transport de molécules endogènes, comme les hormones (Ueda *et al.*, 1992) ou encore les cytokines (Drach *et al.*, 1996).

Globalement, la Pgp peut transporter des molécules de taille allant de 250 Da, pour les plus petites, à 1250 Da pour les plus grosses comme le PSC833 (Boesch *et al.*, 1991).

Applications thérapeutiques	Médicaments
Analgésiques	Asimadoline Morphine
Médicaments anti-cancéreux	Vinca alkaloïdes (vinblastine, vincristine) Taxanes (paclitaxel, docetaxel) Anthracyclines (doxorubicine, daunorubicine, épirubicine) Anthracènes (bisantrene, mitoxantrone) Epipodophyllotoxines (étoposide, teniposide) Actinomycine D Méthotrexate Topotécane
Inhibiteurs de la protéase du VIH	Saquinavir Ritonavir Nelfinavir Indinavir Lopinavir Amprenavir
Antagonistes du récepteur H ₂	Cimétidine
Agents anti-goutte	Colchicine
Agents antidiarrhéiques	Loperamide
<i>Antiemetics</i>	Domperidone Ondansetrone
Inhibiteurs de canaux calciques	Verapamil
Glycosides cardiaques	Digoxine
Agents immunosuppresseurs	Cyclosporine A FK506
Corticoïdes	Dexamethasone Hydrocortisone Corticostérone Triamcinolone
Pesticides, anti-acariens	Ivermectine Abamectine
<i>Amebicides</i>	Emétine
Antibiotiques	Erythromycine Gramicidine D Valinomycine
Sondes de diagnostic	Rhodamine 123 Hoechst 33342

Tableau 6 : Les substrats de la Pgp

2-4- Mécanisme d'efflux de la Pgp

La Pgp est définie comme une pompe membranaire couplant l'hydrolyse de l'ATP à l'efflux de diverses molécules hydrophobes contre leur gradient de concentration. Cependant, les mécanismes de couplage et de reconnaissance d'un éventail aussi large de substrats ne sont encore que partiellement

compris. Il semble que la Pgp prenne en charge la plupart de ses substrats au sein de la bicouche lipidique, avant qu'ils n'atteignent le cytoplasme (figure 16) (Sharom, 1997).

La fixation de l'ATP dans l'un des domaines de liaison au nucléotide (NBD) rendrait actif l'un des sites de reconnaissance des substrats dans les domaines transmembranaire (TMD), la fixation de l'ATP à l'autre NBD l'inactiverait. Cette inactivation réversible d'un site correspondrait à la fermeture transitoire du canal. Par conséquent, la liaison de l'ATP plus que son hydrolyse, fournirait l'énergie initiale pour la translocation du substrat. Puis, l'hydrolyse de l'ATP permettrait un retour du transporteur à son état initial (Higgins et Linton, 2001).

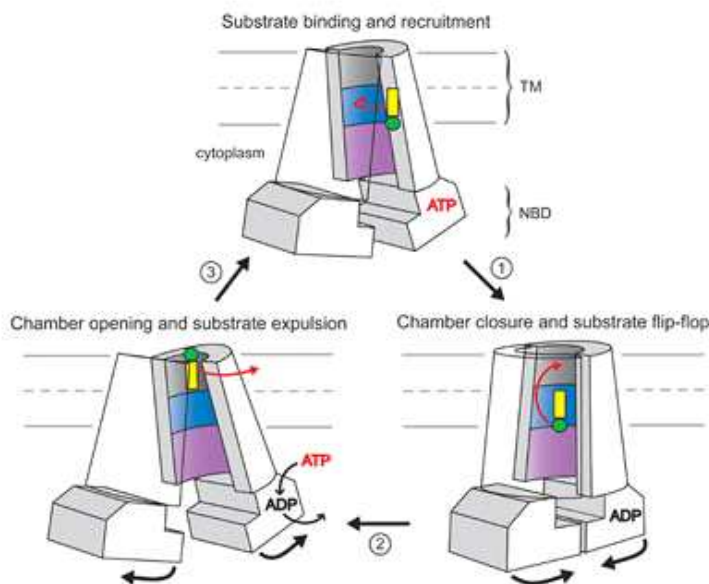


Figure 25 : Mécanismes d'efflux de la Pgp (Higgins, 2001)

2-5- Régulation du gène *mdr1*

Le niveau d'expression du gène *mdr1* varie fortement d'un individu à l'autre en raison de facteurs génétiques (Hoffmeyer *et al.*, 2000) et environnementaux (Licht *et al.*, 1991). En effet, de nombreux facteurs aussi bien endogènes qu'exogènes sont capables de moduler l'expression du gène *mdr1*.

L'analyse du promoteur du gène *mdr1* humain a révélé l'absence de TATA box, compensée par des séquences initiatrices INR. Plusieurs éléments cis-régulateurs sont également présents dans la région promotrice : une GC box (entre les paires de bases -120 à -100), une Y box (motif CCAAT inversé, site de fixation du facteur de transcription NF-Y, entre les paires de bases -80 et -70), une G box (site de fixation pour les facteurs de transcription SP1, entre les paires de bases -70 et -50), un motif de liaison pour le facteur C/EBP β (aussi appelé NF-IL6). Ainsi, les facteurs de transcription AP1, SP1,

AP2, NF-Y, C/EBP β , dont la plupart sont impliqués dans la réponse au stress, peuvent moduler l'expression du gène *mdr1* (Ueda *et al.*, 1987 ; Cornwell et Smith, 1993 ; Goldsmith *et al.*, 1993). CtBP1 (C-terminal-binding protein 1), un co-régulateur transcriptionnel, pourrait activer la transcription du gène *mdr1* (Jin *et al.*, 2007). Un site de liaison pour la protéine P53, qui serait capable de réprimer l'expression du gène *mdr1*, a également été identifié (Johnson et Anderson, 2000). Les mécanismes de régulation de l'expression du gène *mdr1* sont complexes et ne sont encore que très partiellement compris. L'expression et la fonctionnalité de la Pgp peuvent être contrôlés par de très nombreux facteurs au niveau pré ou post-transcriptionnel. Un grand nombre de stimuli ont été identifiés comme modulateurs du gène *mdr1*. *In vitro*, l'exposition à de fortes températures ou à des métaux lourds toxiques, induisent une augmentation des taux d'ARNm. Il semble que plusieurs voies, faisant intervenir des protéines HSP et la protéine Kinase A, sont impliquées (Kim *et al.*, 1996). Les radiations ionisantes peuvent également induire une augmentation de la transcription du gène, dans laquelle interviendrait une modulation de la structure chromatinienne (Jin et Scotto, 1998). Certaines molécules substrats de la Pgp sont également capables de moduler son expression, comme la rifampicine, la cyclosporine A, la digoxine, ou la cisplatine (Greiner *et al.*, 1999 ; Jette *et al.*, 1996 ; Takara *et al.*, 2003). Là encore, différentes voies de signalisation pourraient être impliquées. Les données de la littérature mettent en évidence une corrélation entre l'activité des protéines kinases dépendantes de l'AMPc et l'expression du gène *mdr1* (Rohlf et Glazer, 1995).

Le récepteur nucléaire SXR (Steroid and xenobiotic receptor) a été impliqué dans la régulation du gène *mdr1* en réponse aux xénobiotiques (Synold *et al.*, 2001 ; Takara *et al.*, 2003). En 2001, Dussault *et al.* ont montré dans des cellules LS180 que certains inhibiteurs de la protéase du VIH-1 peuvent se lier au SXR (Dussault *et al.*, 2001). Le ritonavir se lie spécifiquement au SXR et est capable d'activer l'expression de ses gènes cibles, le gène *mdr1* et le gène codant pour CYP3A4. SXR (également appelé PXR ou hPAR) est considéré comme un senseur de xénobiotiques. En effet, il joue un rôle essentiel dans leur métabolisme au niveau intestinal et hépatique, en induisant l'expression de CYP3A4 (Synold *et al.*, 2001). Cette voie de régulation explique la co-induction de la Pgp et de CYP3A4 souvent observée dans la réponse à un substrat (Dresser *et al.*, 2003 ; Magnarin *et al.*, 2004). Les facteurs de transcription de la famille C/EBP constituent probablement une voie importante de régulation du gène *mdr1* par les cytokines pro-inflammatoires. En effet, après une exposition à IL-1 β , IL-6, TNF- α ou au cours de la réponse inflammatoire, une augmentation des taux et de la fonction de C/EBP β (NF-IL6) est observée dans le foie (Akira et Kishimoto, 1992). L'activation du C/EBP β en réponse à l'IL-6 est une voie connue, et pourrait passer par la voie des MAP Kinases et/ou par l'induction de la voie des JAK/STAT (Akira et Kishimoto, 1997).

3- La sous-famille MRP (Multidrug Resistance associated Proteins)

C'est au cours d'une étude sur le phénotype de MDR présenté par une lignée de cellules tumorales de poumon humain qu'a été isolé le premier membre de la famille des MRPs (Cole, 1992). Ces MRPs sont des transporteurs membranaires faisant partie de la sous-famille C des transporteurs ABC qui comprend 12 membres, dont les MRPs 1 à 9 (Dallas *et al.*, 2006).

Ce sont des transporteurs de conjugués glutathionne, glucuronate ou sulfate de substances lipophiles (Jedlitschky *et al.*, 1994 ; Muller *et al.*, 1994 ; Loe *et al.*, 1996). En plus de nombreux conjugués anioniques (Keppler *et al.*, 1998), un certain nombre d'anions amphiphiles non-conjugués peuvent être substrats des MRP1, MRP2 et sans doute d'autres membres de cette famille (Feller *et al.*, 1995 ; Hollo *et al.*, 1996).

3-1- Structure des MRPs

Bien que leur topologie membranaire soit considéré comme similaire, l'homologie de séquence entre la MRP1 et les MRPs 2 à 6 se situe entre 34 et 58%. Elle avoisine les 15% avec la Pgp (Litman *et al.*, 2001). Cependant 2 groupes structuraux peuvent être distingués. En effet, si la structure globale des MRPs 4, 5 et 8 se rapproche de celle de la Pgp, la structure des MRPs 1, 2, 3, 6 et 7 comprend un domaine à 5 segments transmembranaires supplémentaire et le NH₂ terminal se trouve au niveau extracellulaire (figure 23). D'autre part, une analyse exhaustive des polymorphismes de 8 MRPs exprimées chez l'homme montre que l'ensemble de ces MRPs présente un total de 779 variations génétiques (688 SNPs), dont les conséquences sur la fonction et l'expression de ces protéines restent entièrement à déterminer (Saito *et al.*, 2002).

3-2- Localisation des MRPs

L'expression des MRPs est largement distribuée dans l'organisme (tableau 3). Les MRPs sont retrouvées au niveau des membranes plasmiques des cellules tumorales. Toute fois, au niveau des cellules normales, elles sont détectées de façon prédominante dans le cytoplasme.

La MRP1 a été immunolocalisée sur la membrane plasmique de nombreux types cellulaires (Hipfner *et al.*, 1994 ; Flens *et al.*, 1994 ; Flens *et al.*, 1996), ainsi que sur la membrane basolatérale d'épithéliums polarisés (Bréchet *et al.*, 1998 ; Wright *et al.*, 1998 ; Löscher et Potschka, 2005-b). De hauts niveaux d'expression ont été observés dans le rein, le poumon, les testicules et les cellules mononucléées du sang périphérique (Haimeur *et al.*, 2004).

La MRP2 est l'isoforme apicale des MRPs, elle est localisée sur la membrane canaliculaire des hépatocytes (Büchler *et al.*, 1996 ; Paulusma *et al.*, 1997 ; Keppler et Kartenbeck, 1996). Elle a

également été détectée par Northern Blot dans le rein, le duodenum et l'ileum (Paulusma *et al.*, 1996 ; Ito *et al.*, 1997). Sa localisation apicale a été démontrée dans les tubules proximaux de rein chez l'homme et le rat (Schaub *et al.*, 1997 ; Schaub *et al.*, 1999). Son expression dans les cellules circulantes (lymphocytes et monocytes) est, quant à elle, controversée (Laupèze *et al.*, 2001 ; Janneh *et al.*, 2005 ; Albermann *et al.*, 2005).

La MRP3 a été clonée à partir du foie et localisée sur la membrane basolatérale d'hépatocytes humains (König *et al.*, 1999 ; Kool *et al.*, 1999) et de cholangiocytes humains (Kool *et al.*, 1999). Des ARN messagers codant pour la MRP3 ont également été détectés dans le colon, le petit intestin, le pancréas, la prostate et le rein (König *et al.*, 1999 ; Kiuchi *et al.*, 1998 ; Uchiumi *et al.*, 1998).

Au niveau de la barrière hémato-encéphalique, les MRPs 1, 2 et 4 ont été immunolocalisées sur la membrane luminale (Bauer *et al.*, 2005), et les MRPs 1 et 4 également sur la membrane abluminale (Zhang *et al.*, 2004). Mais leur rôle au niveau baso-latéral reste mal connu.

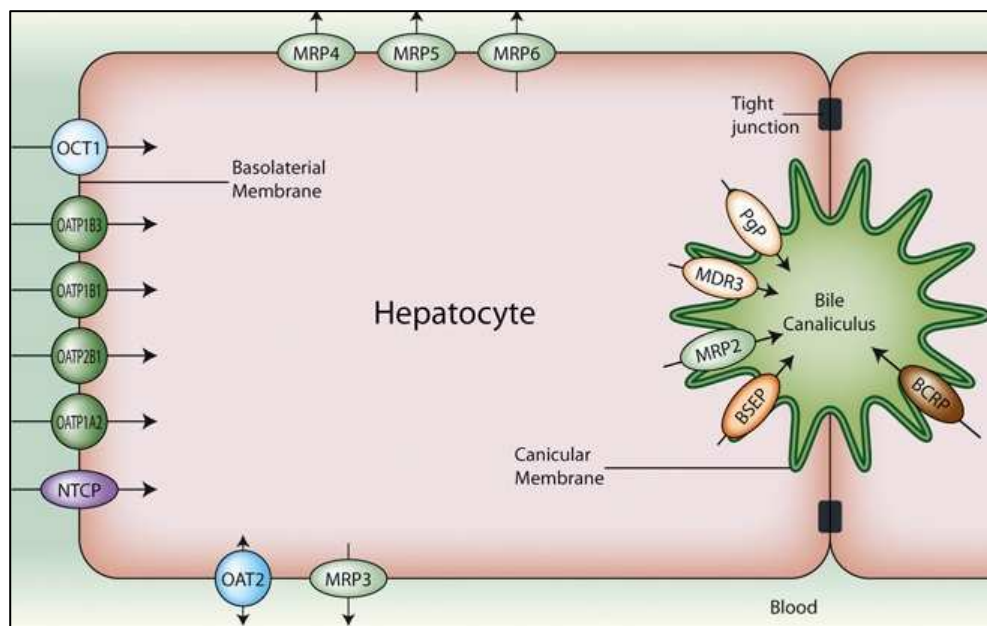


Figure 26 : Localisation des transporteurs d'influx et d'efflux sur les hépatocytes (Source : www.solvobiotech.com)

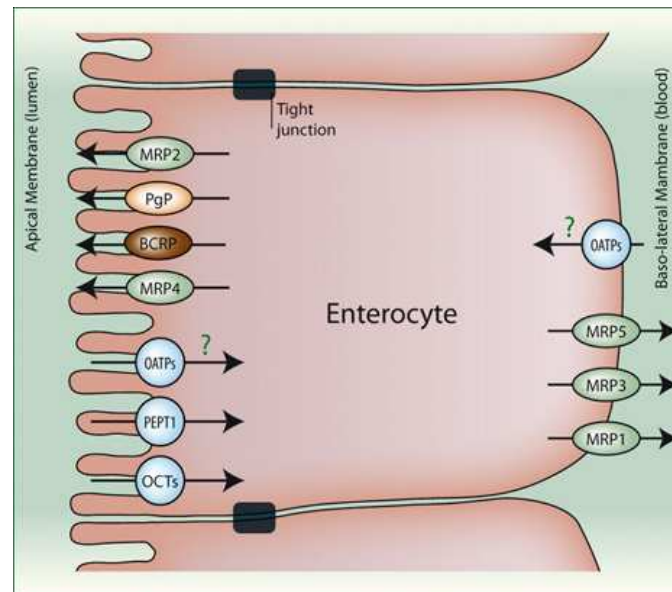


Figure 27 : Localisation des transporteurs d'influx et d'efflux sur les entérocytes (Source : www.solvobiotech.com)

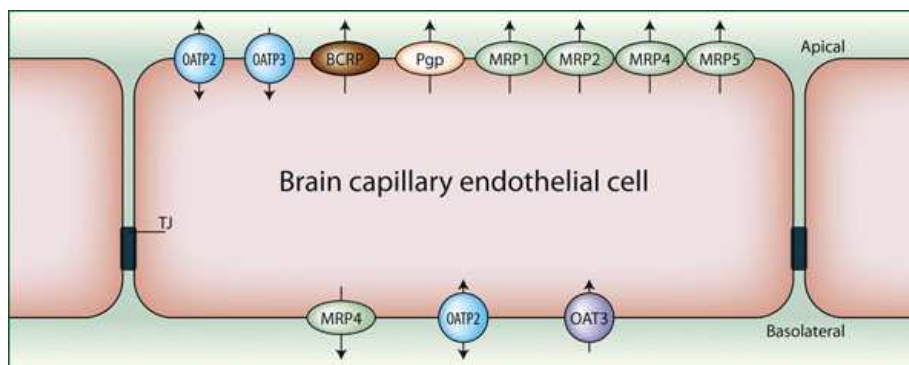


Figure 28 : Localisation des transporteurs d'influx et d'efflux au niveau de la barrière hémato-encéphalique (Source : www.solvobiotech.com)

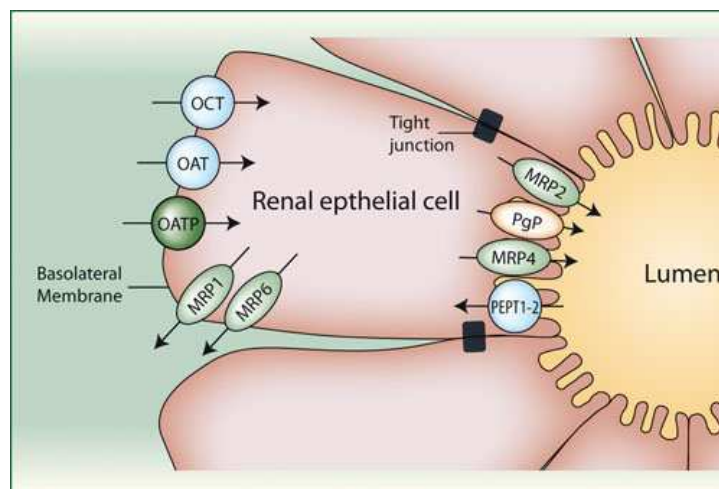


Figure 29 : Localisation des transporteurs d'influx et d'efflux dans les cellules épithéliales rénales (Source : www.solvobiotech.com)

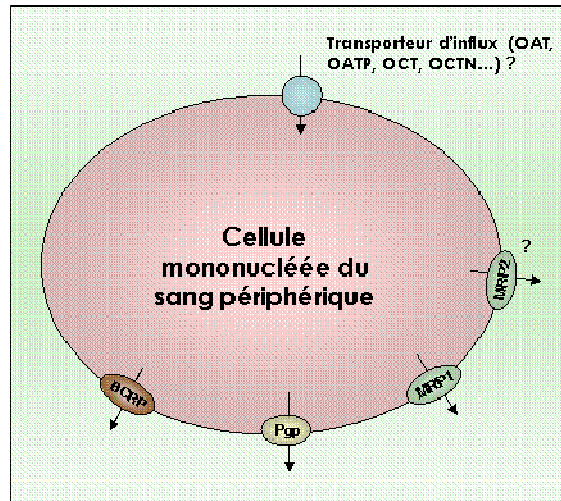


Figure 30 : Localisation des transporteurs d'influx et d'efflux dans les cellules mononucléées du sang périphérique

3-3- Fonction des MRPs

Il semble que les substrats des MRPs soient préférentiellement des anions organiques (Krishna et Mayer, 2000 ; Begley, 2003). D'autre part, ils sont en général plus hydrophiles que ceux de la Pgp (Golden et Pollack, 2003). Le ou les sites de fixation des ces substrats pourraient être cytoplasmiques ou intra-membranaires.

Les spectres de substrats des MRPs 1 et 2 sont en grande partie communs entre eux, ainsi qu'avec celui de la Pgp, mais relativement peu avec ceux des MRPs 4 et 5 (Schinkel et Jonker, 2003 ; Löscher et Potschka, 2005-b).

Le transport assuré par les MRPs 1 et 2 semble nécessiter la présence d'un tripeptide, le glutathion. Deux hypothèses ont été avancées. Le glutathion interviendrait soit en tant que co-substrat, soit par l'intermédiaire de sa conjugaison métabolique aux substrats potentiels (Rappa *et al.*, 1999 ; Krishma et Mayer, 2000 ; Schinkel et Jonker, 2003). De nombreux substrats de ces deux MRPs sont des conjugués métaboliques au glutathion, à l'acide glucuronique, ou encore au sulfate (Begley, 2003 ; Schinkel et Jonker, 2003). Ces transporteurs pourraient donc participer à l'élimination intracellulaire de molécules issues d'une première ou d'une deuxième phase de métabolisme (Sun *et al.*, 2003).

Ces transporteurs ont également pour substrats des anticancéreux tels que le méthotrexate, la doxorubicine ou l'étoposide, des inhibiteurs de la protéase du VIH tels que le ritonavir, le nelfinavir, ou l'indinavir, ou des agents antiépileptiques tels que la phénytoïne (Löscher et Potschka, 2005-b ; Stazielle et Gherzi-Egea, 2005 ; Dallas *et al.*, 2006).

Les MRPs 4 et 5 semblent moins concernées par le transport d'anions organiques, bien qu'elles soient capables de transporter des molécules conjuguées au glutathion et qu'elles soient inhibées par la

sulfinpyrazone, un inhibiteur spécifique des transporteurs d'anions organiques (Litman *et al.*, 2001 ; Schinkel et Jonker, 2003 ; Smeets *et al.*, 2004). Les substrats des MRPs 4 et 5 sont principalement des nucléosides ou nucléotides endogènes, ainsi que des analogues nucléosidiques ou nucléotidiques tels que certains inhibiteurs de la transcriptase inverse du VIH ou bien certains anticancéreux (Stazielle et Ghersi-Egea, 2005 ; Dallas *et al.*, 2006).

<i>MRP substrate specificity</i>			
Protein/Gene	Alternative Names	Substrates	References
MRP1/ <i>ABCC1</i>	MRP; GS-X	Leukotriene C ₄ ; oxidized glutathione; vincristine; daunorubicin; etoposide; methotrexate; glutathione, glucuronide, and sulfate conjugates	Jedlitschky <i>et al.</i> (1996); Loe <i>et al.</i> (1996); Keppler <i>et al.</i> (1997); Rappa <i>et al.</i> (1997); Loe <i>et al.</i> (1998); Hooijberg <i>et al.</i> (1999); Leslie <i>et al.</i> (2005)
MRP2/ <i>ABCC2</i>	cMOAT; cMRP	Similar to MRP1; cisplatin; methotrexate	Jedlitschky <i>et al.</i> (1997); Evers <i>et al.</i> (1998); Suzuki and Sugiyama (1998); Cui <i>et al.</i> (1999); Hooijberg <i>et al.</i> (1999); Kawabe <i>et al.</i> (1999)
MRP3/ <i>ABCC3</i>	MOAT-D cMOAT2 MLP-2*	Monoanionic and conjugated bile acids; etoposide; methotrexate	Hirohashi <i>et al.</i> (2000); Zelcer <i>et al.</i> (2001); Meier and Stieger (2002)
MRP4/ <i>ABCC4</i>	MOAT-B	Cyclic nucleotides (cAMP, cGMP); nucleotide analogs (PMEA, azidothymidine-monophosphate); prostaglandins; methotrexate	Schuetz <i>et al.</i> (1999); Reid <i>et al.</i> (2003a,b); Wielinga <i>et al.</i> (2003)
MRP5/ <i>ABCC5</i>	MOAT-C SMRP	Cyclic nucleotides (cAMP, cGMP); nucleotide analogs (PMEA, stavudine-monophosphate)	Jedlitschky <i>et al.</i> (2000); Wijnholds <i>et al.</i> (2000b); Wielinga <i>et al.</i> (2003); Reid <i>et al.</i> (2003a)
MRP6/ <i>ABCC6</i>	MOAT- E; MLP-1 ^a	Small peptides (BQ123); glutathione conjugates	Madon <i>et al.</i> (2000); Belinsky <i>et al.</i> (2002); Iliás <i>et al.</i> (2002)
MRP7/ <i>ABCC10</i> MRP8/ <i>ABCC11</i>		Estradiol-17 β -glucuronide; leukotriene C ₄ ; docetaxel Nucleotide analogs (PMEA), DHEAS, fluoropyrimidines	Chen <i>et al.</i> (2003); Hopper-Borge <i>et al.</i> (2004) Guo <i>et al.</i> (2003); Chen <i>et al.</i> (2005b)
MRP9/ <i>ABCC12</i>		N.A.	Bera <i>et al.</i> (2002)

MOAT, multispecific organic anion transporter; N.A., not available; SMRP, short MRP; DHEAS, dehydroepiandrosterone 3-sulfate.

^a The MLP-1 and MLP-2 proteins were subsequently identified as rat orthologs of MRP6 and MRP3, respectively.

Tableau 7 : Les substrats des MRPs (Dallas *et al.*, 2006)

3-4- Régulation des MRPs

Concernant les mécanismes de régulation de l'expression des MRPs, peu de données sont disponibles. Cependant, des éléments GC, permettant la liaison de Sp1, ont été identifiés au niveau du promoteur du gène *mrp* (Zhu et Center, 1996). La transfection de vecteur d'expression incluant la région promotrice de la MRP6, a permis d'identifier une séquence de liaison aux facteurs de transcription NF κ B et à la protéine Sp1, conférant alors un haut niveau d'expression du transporteur (Jiang *et al.*, 2006).

La protéine p53 est capable de réprimer la transcription du gène *mrp1* (Bähr *et al.*, 2001 ; Sullivan *et al.*, 2000 ; Wang et Beck, 1998) ; à l'inverse, la diminution d'expression de p53 est corrélée à une augmentation d'expression de la MRP1 (Fukushima *et al.*, 1999).

Il semblerait que la régulation de l'expression de la MRP2 soit, comme pour la Pgp, sous l'influence de facteurs de transcription de la classe des récepteurs nucléaires orphelins comme PXR (chez le rongeur) / SXR (chez l'homme), FXR (Farnesoid X-activated Receptor) et CAR (Constitutive Androstane Receptor) (Kast *et al.*, 2002).

4- La sous-famille BCRP (Breast Cancer Resistance Protein)

La BCRP a été découverte en 1997 sur une lignée de cellules humaines du cancer du sein présentant une résistance croisée à différents agents anticancéreux mais ne surexprimant ni la Pgp, ni les MRPs (Doyle *et al.*, 1998). Il s'agissait d'un nouveau transporteur ABC conférant le phénotype MDR. Le gène de la BCRP a également été cloné par 2 autres équipes qui l'ont appelé *MXR* (pour résistance à la mitoxantrone, Miyake *et al.*, 1999) et *ABCP* (pour transporteur ABC placentaire, Allikmets *et al.*, 1998).

4-1- Structure de la BCRP

Le gène de la BCRP humaine code pour une protéine de 655 acides aminés, contenant un seul domaine de liaison à l'ATP en N-terminal, suivi d'un domaine de 6 segments transmembranaires (figure 23). Basé sur des homologues de structure et de séquence, la BCRP appartient à la sous-famille G des transporteurs ABC (ABCG2). Par analogie avec d'autres transporteurs ABC analysés à ce jour, il semblerait que la BCRP agisse sous forme d'homo- ou d'hétérodimère (Van Veen *et al.*, 2000 ; Chang et Roth, 2001 ; Ewart et Howells, 1998). L'homodimérisation de la BCRP pourrait être nécessaire au transport de substrats (Kage *et al.*, 2002).

4-2- Localisation de la BCRP

De hauts niveaux d'expression de la BCRP ont été retrouvés dans le placenta, le colon, l'intestin et le foie (Ito *et al.*, 2005 ; Meyer zu Schwabedissen *et al.*, 2006). Des études immuno-histochimiques ont permis de détecter la BCRP sur la membrane plasmique du syncytiotrophoblaste placentaire, sur la membrane canaliculaire des hépatocytes et sur la membrane luminale des cellules épithéliales du petit et du gros intestin (Maliepaard *et al.*, 2001). Elle a également été retrouvée au niveau du sein, au niveau des cellules endothéliales de capillaires et de veines dans pratiquement tous les tissus analysés, mais pas au niveau de l'endothélium artériel. Maliepaard *et al.* n'ont pas détecté de BCRP dans les érythrocytes, les leucocytes et les plaquettes (Maliepaard *et al.*, 2001). Cependant, Albermann *et al.* ont trouvé des ARN messagers de *bcrp* dans les cellules mononucléées du sang périphérique (Albermann *et al.*, 2005).

4-3- Fonction de la BCRP

La distribution tissulaire de la BCRP est proche de celle de la Pgp, suggérant qu'elles ont des fonctions similaires dans la prise en charge de substrats pharmacologiques. La BCRP semble avoir un

rôle important au niveau de la pharmacocinétique et la pharmacodynamique de certains xénobiotiques et substrats endogènes (Cascorbi, 2006). Elle contribue ainsi à la résistance à de nombreux anticancéreux tels que la doxorubicine, l'irinotecan, le méthotrexate, la mitoxantrone, le topotecan ; à des antihistaminiques tels que la cimétidine ; à des sondes fluorescentes telles que le Hoechst 3342, la prazosine, le BBR3390 (Borst *et al.*, 1999 ; Jonker *et al.*, 2002 ; Ito *et al.*, 2005). La BCRP interagit avec les porphyrines et protègent les cellules et/ou les tissus de l'accumulation de protoporphyrines en conditions hypoxiques (Krishnamurthy et Schuetz, 2005).

Le caractère lipophile de la majorité des substrats de la BCRP laisse penser que leur(s) site(s) de fixation se trouvent au niveau intramembranaire.

4-4- Régulation de la BCRP

L'expression de la BCRP serait modulée par EGF (Epidermal Growth Factor), par activation de la voie des MAP Kinases (mitogene-activated phosphokinase) via la phosphorylation de ERK 1 et 2 (extracellular regulated kinase) et de JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinase / stress-activated protein kinase) (Meyer zu Schwabedissen *et al.*, 2006).

Un élément de réponse aux œstrogènes (ERE) a été découvert au niveau de la séquence promotrice de la BCRP (Ee *et al.*, 2004). Des œstrogènes tels que le 17 β -œstradiol, pourraient moduler l'expression de la BCRP par l'intermédiaire du récepteur aux œstrogènes- α , de manière différentielle selon le type cellulaire étudié (Ee *et al.*, 2004 ; Imai *et al.*, 2005).

5- Transporteurs ABC et VIH

5-1- Effet de l'infection par le VIH sur l'expression des transporteurs

Les études publiées portant sur la relation entre l'expression des transporteurs ABC et l'infection par le VIH ont donné lieu à des résultats contradictoires. Ces différences sont vraisemblablement dues aux variations de sélection et stratification des cohortes de patients, aux types cellulaires, ou encore aux différences analytiques.

Ainsi Lucia *et al.* ont montré une diminution d'expression de la Pgp sur les lymphocytes CD4⁺ de patients infectés (Lucia *et al.*, 1995-a). Cette diminution a été confirmée par d'autres études (Meaden *et al.*, 2001 ; Lucia *et al.*, 2002 ; Jorajuria *et al.*, 2003). Cependant, certains travaux ont montré que le niveau d'expression de la Pgp dans les lymphocytes T et les monocytes augmentait durant l'infection à VIH (Gollapudi et Gupta, 1990). Le niveau d'expression de la Pgp augmenterait dans les lymphocytes CD4⁺ de patients infectés et augmenterait avec la progression de la maladie (Andreana *et al.*, 1996 ;

Gupta et Gollapudi, 1993). De plus, Camus *et al.* ont montré une augmentation des ARN messagers de *mdr1* dans les trophoblastes placentaires de patientes infectées (Camus *et al.*, 2006).

Il semblerait également que cette régulation d'expression de la Pgp soit accompagnée par une diminution de son activité (Andreana *et al.*, 1996 ; Lucia *et al.*, 1995-a). Une diminution significative de la fonctionnalité de la Pgp a été trouvée dans les cellules NK CD16+ (Natural Killer) chez les patients infectés par le VIH-1. Cette diminution devient plus importante avec la progression de la maladie et semble corrélée avec une diminution de la fonction cytotoxique de ces cellules (Lucia *et al.*, 1995-a ; Lucia *et al.*, 1995-b).

Par ailleurs, l'expression de la MRP1 dans les lymphocytes ne semble pas altérée par l'infection (Meaden *et al.*, 2001). L'exposition de macrophages humains au VIH produirait une augmentation tardive de l'expression des MRPs 1 et 5 indépendamment de la production de cytokines. La surexpression de la MRP4 induite par le VIH semble, quant à elle, transitoire et corrélée à la libération de TNF- α (Jorajuria *et al.*, 2004-b). Des phénomènes de régulation différents selon les MRPs et selon le type cellulaire seraient impliqués.

5-2- Effet des transporteurs sur la réplication virale

Les transporteurs peuvent influencer l'infectiosité et la réplication du VIH.

In vitro, l'expression de la Pgp sur les lymphocytes T inhibe la fusion du virus avec la membrane plasmique de la cellule hôte, et retarde également la réplication virale. Cette diminution de la réplication est corrélée au niveau d'expression de la Pgp (Lee *et al.*, 2000 ; Speck *et al.*, 2002). Cette inhibition serait indépendante de l'activité ATPasique de la Pgp et pourrait en partie résulter d'une liaison directe du virus avec le transporteur (Lee *et al.*, 2000). De plus, lorsque les cellules sont incubées avec de la quinidine ou du PSC833 (inhibiteurs de la Pgp), le niveau de production virale dans ces cellules augmente.

En revanche, l'expression de la MRP1 semblerait augmenter l'infectiosité virale (Speck *et al.*, 2002). Cet effet serait spécifique de la MRP1, puisqu'il est partiellement inversé par ses inhibiteurs. Il interviendrait dans les phases précoces du cycle viral, comme pour la Pgp.

In vivo sur des lymphocytes CD4+ et CD8+ de patients VIH+ traité ou non, il existerait une relation inverse entre l'activité de la Pgp et les taux plasmatiques d'ARN viraux, mais aucune relation avec le traitement. Ces données vont dans le sens de celles obtenues *in vitro*, et suggèrent qu'un des rôles de la Pgp pourrait être d'inhiber la réplication virale (Hulgan *et al.*, 2003).

6- Transporteurs ABC et traitements antirétroviraux

6-1- Antirétroviraux substrats des transporteurs ABC

Afin de démontrer l'interaction d'une molécule avec un transporteur ABC, différentes techniques ont été mises en place. En effet, elle peut être mise en évidence par le suivi de la fonction enzymatique, c'est-à-dire l'activité ATPasique du transporteur en présence du substrat potentiel. Ainsi des systèmes de vésicules « inside-out » issues de membranes de lignées cellulaires surexprimant la Pgp, ont été développées afin de pouvoir suivre l'activité ATPasique de la Pgp par spectrophotométrie (Mégard *et al.*, 2002 ; Jorajuria *et al.*, 2004-a ; Ray *et al.*, 2006). Cependant, la preuve directe du transport d'une molécule par un transporteur, est apportée par l'étude du transport bidirectionnel de celle-ci à travers une monocouche de cellules surexprimant le transporteur d'intérêt, en présence et en absence d'inhibiteurs spécifiques. Les lignées cellulaires surexprimant la Pgp peuvent être soit des lignées sélectionnées pour leur résistance à un substrat connu (par exemple la vinblastine, Aungst *et al.*, 1999), soit des lignées transfectées et surexprimant le gène *mdr1* (Ray *et al.*, 2006 ; Agarwal *et al.*, 2007).

Un dernier modèle consiste à comparer la biodistribution d'une molécule d'intérêt dans des animaux « knock-out » pour le gène *mdr1* et des animaux de type sauvage (Schinkel *et al.*, 1994 ; Kim *et al.*, 1998)

6-1-1- Substrats de la Pgp

Même si des informations manquent sur les derniers inhibiteurs de la protéase du VIH mis sur le marché, il semblerait que tous les IPs étudiés à ce jour (ritonavir, saquinavir, indinavir, nelfinavir, amprénavir, lopinavir, atazanavir) soient substrats de la Pgp. En 1998, plusieurs équipes ont montré simultanément l'interaction des IPs avec la Pgp, à partir de préparations de vésicules membranaires (Lee *et al.*, 1998), de lignées cellulaires (Washington *et al.*, 1998), ou bien *in vivo* chez des souris « knock-out » *mdr1a* (-/-) (Kim *et al.*, 1998). Par la suite, d'autres équipes ont montré sur différents modèles que les IPs, dont récemment le lopinavir et l'atazanavir, pouvaient être substrats de la Pgp (Polli *et al.*, 1999 ; Jones *et al.*, 2001-a ; Van der Sandt *et al.*, 2001 ; Agarwal *et al.*, 2007 ; Janneh *et al.*, 2007 ; Roucairol *et al.*, 2007). *In vivo*, chez des souris, le saquinavir serait transporté par la Pgp, au niveau de la barrière hémato-encéphalique (Park et Sinko, 2005).

Alors qu'il est généralement admis que les IPs sont transportés par la Pgp, les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse, eux, ne semblent pas être substrats de la Pgp (Stormer *et al.*, 2002 ; Dirson *et al.*, 2006).

En ce qui concerne les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse, quelques études ont été menées dans les années 1990, montrant que l'AZT était substrat de la Pgp (Gollapudi et Gupta, 1990 ; Yusa *et al.*, 1990 ; Antonelli *et al.*, 1992 ; Aungst *et al.*, 1999). Le ténofovir, quant à lui, ne semble pas être transporté par la Pgp (Ray *et al.*, 2006).

6-1-2- Substrats des MRPs

Plusieurs études, parfois contradictoires du fait de la multiplicité des modèles utilisés, se sont intéressées au rôle des MRPs dans le transport des IPs. Il semblerait que l'indinavir, le ritonavir, le saquinavir et le nelfinavir soient substrats de la MRP1 (Jones *et al.*, 2001-a ; Van der Sandt *et al.*, 2001, Williams *et al.*, 2002). Dans ces modèles, seul l'amprénavir échapperait à la règle.

Cependant, dans des lignées canines surexprimant les différentes MRPs, ces mêmes IPs (ritonavir, indinavir, saquinavir), ainsi que le lopinavir, seraient transportés par la MRP2, mais pas par les MRPs 1, 3 et 5 (Huisman *et al.*, 2002 ; Agarwal *et al.*, 2007). Roucairol *et al.* ont montré récemment dans des lignées cellulaires lymphoblastoïdes, que l'atazanavir pouvait être substrat des MRPs (Roucairol *et al.*, 2007). *In vivo*, chez des souris, le saquinavir serait transporté par les MRPs, au niveau de la barrière hémato-encéphalique (Park et Sinko, 2005). Ceci a été confirmé par une étude récente montrant que l'efflux de saquinavir des cellules endothéliales (cérébrales et aortiques) serait inhibé spécifiquement par le MK571, inhibiteur des MRPs (Eilers *et al.*, 2008).

En ce qui concerne les INTIs, Schuetz *et al.* ont montré sur des lignées lymphoïdes, qu'une diminution de la cytotoxicité de l'AZT-MP (monophosphate) pouvait être attribué à la surexpression de la MRP4 (Schuetz *et al.*, 1999). L'AZT serait transporté par les MRPs au niveau des cellules endothéliales (cérébrales et aortiques) (Eilers *et al.*, 2008). Le ténofovir semble également être transporté par la MRP4, mais pas par la MRP2 (Ray *et al.*, 2006). La MRP4 semble donc être un acteur majeur dans le transport des analogues monophosphorylés de l'adénosine.

6-1-3- Substrats de la BCRP

Rares sont les données disponibles sur les antirétroviraux substrats de la BCRP. Seuls les IPs (ritonavir, saquinavir, indinavir, nelfinavir, amprénavir, lopinavir) ont été étudiés et ne semblent pas substrats de la BCRP (Huisman *et al.*, 2002 ; Gupta *et al.*, 2004 ; Agarwal *et al.*, 2007).

Transporteur	Référence	Modèle cellulaire	IPs						INNTIs			INTIs			
			RTV	IIIV	SQV	IFV	AMV	LPV	ATV	EFV	IIVR	DLV	TFV	AZT	AZT-MP
Pgp	Lee et al., 1998	vésicules	V	V	V										
	Washington et al., 1998	Lignées	V		V										
	Kim et al., 1998	souris		V	V										
	Polli et al., 1999	Caco-2	V	V	V		V								
	Jones et al., 2001	CEM	V	V	V										
	Van der Sandt et al., 2001	LLC-PK1	V	V			V								
		Caco-2	V	V			V								
	Megard et al., 2002	BHE bovine	V	V			V								
	Park et Sinko, 2005	BHE humaine	V	V			V								
	Ray et al., 2006	Souris		V											
	Agarwal et al., 2007	MDCKII-MDR1													
	Janneh et al., 2007	MDCKII-MDR1													
	Roucairol et al., 2007	OMSPs													
	Roucairol et al., 2007	CEM													
	Gollapudi et Gupta, 1990	H9-VIH+													
	Yusa et al., 1990	U937-VIH+													
	K562/ADM														
	CEM VLB100														
	AdhRMCF-7														
	Stormer et al., 2002	CEM VBL100													
	Dirson et al., 2006	Caco-2													
		rat													
MRP	Schuetz et al., 1999	Lignée lymphoïde (MRP4)													
	Ray et al., 2006	MDCKII-MRP2													
		MDCKII-MRP4													
	Van der Sandt et al., 2001	LLC-PK1	V	V											
		Caco-2	V	V											
		BHE bovine	V	V											
	Jones et al., 2001	CEM	V												
	Huisman et al., 2002	MDCKII-MRP1	X	X	V										
		MDCKII-MRP2	V	V	V										
		MDCKII-MRP3	X	X	V										
		MDCKII-MRP5	X	X	X										
	Williams et al., 2002	MDCKII-MRP1	X	X	V										
		MDCKII-MRP2			V										
	Park et Sinko, 2005	Souris			V										
	Agarwal et al., 2007	MDCKII-MRP1													
	Roucairol et al., 2007	MDCKII-MRP2													
Ellers et al., 2008	CEM														
Janneh et al., 2007	endothelial cells														
	OMSPs														
BCRP	Huisman et al., 2002	MDCKII-BCRP1	X	X	X										
	Gupta et al., 2004	HEK293	X	X											
	Agarwal et al., 2007	MDCKII-BCRP1													

Tableau 8 : Récapitulatif non exhaustif des antirétroviraux substrats des transporteurs ABC (V : Substrat ; X : Non substrat)

6-2- Effet inhibiteur des antirétroviraux sur les transporteurs ABC

Il s'agit, ici, d'un effet direct du médicament sur le transporteur. Dans la plupart des cas, les molécules étudiées inhibent l'efflux d'un substrat spécifique des transporteurs ABC. Les inhibiteurs de la protéase (saquinavir, atazanavir, lopinavir) semblent inhiber l'efflux de Rhodamine 123, substrat spécifique de la Pgp (Kim *et al.*, 1998 ; Perloff *et al.*, 2005 ; Vishnuvardhan *et al.*, 2003). Le saquinavir, le nelfinavir, le ritonavir et l'indinavir inhiberaient l'efflux de paclitaxel, de vinblastine ou de calcein-acétoxyméthylester, dans des lignées surexprimant la Pgp (Washington *et al.*, 1998 ; Srinivas *et al.*, 1998). Ils en est de même pour quelques inhibiteurs de l'intégrase en cours de développement, qui inhiberaient l'efflux de doxorubicine (Cianfiglia *et al.*, 2007). L'accumulation de saquinavir dans des cellules endothéliales cérébrales de porc serait favorisée par le ritonavir, l'indinavir et le nelfinavir (Drewe *et al.*, 1999). L'atazanavir inhiberait l'efflux de doxorubicine dans des cellules mononucléées du sang périphérique (Lucia *et al.*, 2005). Le saquinavir, l'indinavir et le ritonavir inhiberaient, eux, l'efflux de digoxine dans une lignée cellulaire microgliales (Lee *et al.*, 2001). Les équipes de Bachmeier et de Storch ont fait un classement du pouvoir inhibiteur des IPs vis-à-vis de la Pgp (nelfinavir > ritonavir > tipranavir > lopinavir > saquinavir > amprénavir > atazanavir) (Bachmeier *et al.*, 2005 ; Storch *et al.*, 2007). Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse, ainsi que l'abacavir et le ténofovir disoproxyl fumarate, sembleraient également inhiber la Pgp (Storch *et al.*, 2007).

En ce qui concerne l'effet des antirétroviraux sur les MRPs, les inhibiteurs de la protéase seraient également à prendre en compte dans l'inhibition de la MRP1 (Srinivas *et al.*, 1998). Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse, ainsi que l'emtricitabine, la lamivudine et le ténofovir, sembleraient également inhiber les MRPs 1, 2 et 3. L'abacavir, lui, n'inhiberait que les MRPs 1 et 2 (Weiss *et al.*, 2007-b).

L'inhibition de la BCRP a très peu été étudiée. Seule une étude montre une inhibition de l'efflux de mitoxantrone et de bodipy-prazosine, dans des lignées surexprimant la BCRP humaine, et fait un classement du pouvoir inhibiteur des molécules (lopinavir > nelfinavir > delavirdine > efavirenz > saquinavir > atazanavir > amprénavir > abacavir) (Weiss *et al.*, 2007-a).

Références	Traitements	Inhibition	Substrats	Modèles
Kim et al., 1998	SOV	Pgp	Rho123	Lignée HCT8
Drewe et al., 1999	RTV, IDV, IIFV	Pgp	Saquinavir	Cellules endothéliales cérébrales de porc
Perloff et al., 2005	ATV	Pgp	Rho123	Passage Caco-2
Vishnuvardhan et al., 2003	LPV	Pgp	Rho123	Passage Caco-2
Storch et al., 2007	IIFV > RTV > TPV > LPV > DLV > SOV > APV > ATV > EFV > IIVR > ABC > TDF	Pgp	Rho123 Calcein-AM	Lignée L-MDR1
Washington et al., 1998	SOV, RTV, IIFV	Pgp	[³ H]-paclitaxel [³ H]-vinblastine	Cellules Pgp +
Srinivas et al., 1998	SOV, IDV, RTV, IIFV	Pgp	Calcein-AM	CEM/VBL100
Lee et al., 2001	SOV, IDV, RTV	Pgp	Digoxine	MLS-9
Bachmeier et al., 2005	IIFV > RTV > SOV > APV > IDV	Pgp	Rho123	Cellules endothéliales cérébrales de bœuf
Lucia et al., 2005	ATV	Pgp, MRP	Doxorubicine	PBMCs
Cianfiglia et al., 2007	RDS 1974, RDS 1983, RDS 1984, RDS 1996	Pgp	Doxorubicine	CEM/VBL100
Srinivas et al., 1998	SOV, IDV, RTV, IIFV	MRP1	Calcein-AM	CEM/VM-1-5
Weiss et al., 2007-b	DLV, EFV, IIVR, FTC, 3TC, TFV	MRPs 1, 2 et 3	5-chloromethyl fluorescein diacetate	MDCKII/MRP1, MDCKII/MRP2, MDCKII/MRP3
Weiss et al., 2007-b	ABC	MRPs 1 et 2		
Weiss et al., 2007-a	LPV > IIFV > DLV > EFV > SOV > ATV > APV > ABC	BCRP	Mitoxantrone bodipy-prazosine	MDCKII/BCRP

Tableau 9 : Tableau récapitulatif de l'effet des antirétroviraux sur l'efflux médié par les transporteurs ABC (**inhibiteurs de la protéase**, **inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse**, **inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse**, **inhibiteurs de l'intégrase**).

6-3- Effet des antirétroviraux sur l'expression et la fonctionnalité des transporteurs ABC

In vitro, toutes les données disponibles semblent aller dans le même sens, quelque soit le modèle utilisé. Les inhibiteurs de la protéase semblent augmenter l'expression de la Pgp (Perloff *et al.*, 2000 ; Huang *et al.*, 2001 ; Vishnuvardhan *et al.*, 2003 ; Chandler *et al.*, 2003 ; Ford *et al.*, 2003 ; Dupuis *et al.*, 2003 ; Perloff *et al.*, 2004 ; Perloff *et al.*, 2005 ; Perloff *et al.*, 2007). Il en est de même pour les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (efavirenz, névirapine) (Chandler *et al.*, 2003 ; Störmer *et al.*, 2002) ; ainsi que pour l'AZT (Signoretti *et al.*, 1997 ; Jorajuria *et al.*, 2004-a). Quelques inhibiteurs de l'intégrase, actuellement en développement, semblent avoir le même effet sur ce transporteur (Cianfriglia *et al.*, 2007). Le saquinavir et le ritonavir semblent également augmenter la fonctionnalité de la Pgp (Dupuis *et al.*, 2003 ; Perloff *et al.*, 2004).

Une étude récente sur des cellules en lignées LS-180 montrent qu'une exposition prolongée à de fortes doses de médicaments (névirapine, delavirdine, efavirenz, stavudine, emtricitabine, lamivudine et didanosine) provoquent une augmentation de la fonctionnalité de la Pgp (Weiss *et al.*, 2008). Par contre dans ces mêmes conditions, l'abacavir, la zalcitabine, l'AZT, le ténofovir n'ont aucun effet (Weiss *et al.*, 2008).

En ce qui concerne les MRPs, les données sont beaucoup plus rares. Seule une étude montre que l'AZT augmenterait l'expression des MRPs 4 et 5 (Jorajuria *et al.*, 2004-a). Une étude sur le ritonavir montre qu'il pourrait augmenter l'expression et la fonctionnalité de la MRP1 (Perloff *et al.*, 2001).

In vivo, il ne semble pas y avoir de corrélation entre l'effet des traitements de patients sous multi-thérapies antirétrovirales (HAART), et l'expression et la fonctionnalité de la Pgp dans les cellules mononucléées du sang périphérique (Lucia *et al.*, 2002 ; Bossi *et al.*, 2003 ; Ford *et al.*, 2003). Seule l'équipe de Jorajuria *et al.* ont montré une diminution de l'expression de la Pgp chez des macaques infectés par le SHIV et traités par une polychimiothérapie antirétrovirale (Jorajuria *et al.*, 2003). Une étude récente a également présenté une diminution de la fonctionnalité de la Pgp chez des patients traités par du lopinavir « boosté » avec du ritonavir (Wyen *et al.*, 2008).

	Références	Traitements	Expression	Activité	Modèles
In Vitro	Perloff et al., 2000	RTV>APV=IIFV>SOV>IDV	Pgp ↑		Cellules LS-180
	Huang et al., 2001	APV, IIFV, RTV	Pgp ↑		Cellules LS-174T
	Vishnuvardhan et al., 2003	LPV	Pgp ↑		Cellules LS-180
	Chandler et al., 2003	IIFV	Pgp ↑		CMSPs
	Ford et al., 2003	IIFV	Pgp ↑		CMSPs
	Dupuis et al., 2003	SOV	Pgp ↑	Pgp ↑	Lignées lymphoblastoïdes CD4
	Perloff et al., 2004	RTV	Pgp ↑	Pgp ↑	Cellules endothéliales cérébrales de rat
	Perloff et al., 2005	ATV	Pgp ↑		Cellules LS-180
	Perloff et al., 2007	RTV	Pgp ↑		Cellules endothéliales cérébrales bovines
	Signoretti et al., 1997	AZT	Pgp ↑		Cellules lymphoblastoïdes
	Jorajuria et al., 2004	AZT	Pgp ↑		MDMs
	Chandler et al., 2003	EFV	Pgp ↑		CMSPs
	Störmer et al., 2002	IIVR	Pgp ↑	Pgp ↑	Cellules LS-180
	Weiss et al., 2008	IIVR, DLV, EFV		Pgp ↑	Cellules LS-180
		d4T, FTC, 3TC, ddI		Pgp ↑	Cellules LS-180
		ABC, ddC, AZT, TFV		Pgp =	Cellules LS-180
	Cianfriglia et al., 2007	RDS 1974, RDS 1983, RDS 1984, RDS 1996	Pgp ↑	Pgp ↑	Cellules CEM
	Jorajuria et al., 2004	AZT	MRP 4 et 5 ↑		MDMs
	Perloff et al., 2001	RTV	MRP1 ↑	MRP1 ↑	Cellules LS-180
In vivo	Lucia et al., 2002	} HAART	Pgp =	Pgp =	CMSPs VIH+
	Bossi et al., 2003		Pgp =	Pgp =	Lymphocytes CD4+ VIH+
	Ford et al., 2003		Pgp =	Pgp =	CMSPs VIH+
	Jorajuria et al., 2003		Pgp ↓		CMSPs (macaques)
	Wyen et al., 2008	LPV boosté au RTV		Pgp ↓	Patients sous HAART

Tableau 10 : Tableau récapitulatif de l'effet des antirétroviraux sur l'expression et la fonctionnalité des transporteurs ABC (**inhibiteurs de la protéase**, **inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse**, **inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse**, **inhibiteurs de l'intégrase**).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1- Matériel

1-1- Produits chimiques, milieux de culture, anticorps

Produits	Fournisseurs
Acetonitrile (HPLC grade)	Merck, Darmstadt, Allemagne
Acides aminés non essentiels	Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France
Acide formique	Merck, Darmstadt, Allemagne
Albumin bovine serum (BSA)	Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France
Anti-GFAP	Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France
Argon U	Messer, Paris, France
Atazanavir	Bristol-Myers Squibb, New York, Etats-Unis
Aqualuma Plus	Amersham, Buckingham-shire, Grande Bretagne
Calcéine acéthoxyméthylester	Interchim, Montluçon, France
CD4:FITC	Beckman Coulter, Roissy, France
CD8:PC5	Beckman Coulter, Roissy, France
CD11b:FITC	Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France
CD31:PE	Becton Dickinson, Le-Pont-De-Claix, France
CellFIX™	Becton Dickinson, Le-Pont-De-Claix, France
2-chloroadenosine (2CADO)	Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France
Collagénase Dispase	Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne
Collagène IV	Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France
Cyclosporine A	Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France
CytoFIX / CytoPERM™	Becton Dickinson, Le-Pont-De-Claix, France
³ H-Digoxine	PerkinElmer, Courtabœuf, France
Diméthyl Sulfoxyde (DMSO)	Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France
DNase 1	Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne
Emtricitabine	Gilead Sciences, Foster City, Etats-Unis
FGFb (basic Fibroblast Factor)	Lonza, Saint Beauzire, France
Fibronectine	Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France
Ficoll Histopaque®	Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France
Fumitremorgine C	Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France
Hepes	Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France
IgG monoclonal de souris anti-lapin	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Etats-Unis
IgG1:FITC	Beckman Coulter, Roissy, France
IgG1:PC5	Beckman Coulter, Roissy, France
IgG1:rPE	R&D Systems, Lille, France
IgG2a:rPE	Beckman Coulter, Roissy, France
IgG2a	Becton Dickinson, Le-Pont-De-Claix, France
Immunoglobulines de chèvre anti-souris marqué R-phycoérythrine	Becton Dickinson, Le-Pont-De-Claix, France
GeneElute™ mammalian total RNA Kit	Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France
Glutamine	Gibco, Cergy-Pontoise, France
Kit de toxicologie <i>in vitro</i> MTT	Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France
Kit facteurs de croissance milieu endothélial	Lonza, Saint Beauzire, France
KO143	Schinkel, Nieuwegein, Pays-Bas
Lopinavir	Abbott Laboratories, Illinois, Etats-Unis
Méthanol (HPLC grade)	Merck, Darmstadt, Allemagne
Milieu Cellules endothéliales	Sciencell, San Diego, Etats-Unis
Milieu EMB-2	Lonza, Saint Beauzire, France
Milieu F12	Gibco, Cergy-Pontoise, France
Milieu HBSS sans CaCl ₂ ni MgCl ₂	Gibco, Cergy-Pontoise, France
Milieu αMEM	Gibco, Cergy-Pontoise, France

Produits	Fournisseurs
Milieu RPMI-1640	Gibco, Cergy-Pontoise, France
MK571	Calbiochem, Fontenay-sous-Bois, France
Nitrogène HP45	Messer, Paris, France
Pénicilline / Streptomycine / Néomycine	Gibco, Cergy-Pontoise, France
Phospahte buffer saline (PBS) sans CaCl ₂ ni MgCl ₂	Gibco, Cergy-Pontoise, France
Poly-L-lysine	Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France
Probenecide	Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France
PSC833	Sanofi-Aventis, Paris, France
Ritonavir	Abbott Laboratories, Illinois, Etats-Unis
RT ² first strand Kit	Superarray Biosciences Corporation, Frederick, Etats-Unis
RT ² PCR Profiler Array	Superarray Biosciences Corporation, Frederick, Etats-Unis
Sérum humain	Gibco, Cergy-Pontoise, France
Sérum de veau fœtal (SVF)	Gibco, Cergy-Pontoise, France
¹⁴ C-Sucrose	Amersham, Buckingham-shire, Grande Bretagne
Tampon Perm/Wash™	Becton Dickinson, Le-Pont-De-Claix, France
TLCK (antiprotéase)	Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France
QCRL:rPE (anticorps anti-MRP1)	R&D Systems, Lille, France
UIC2:rPE (anticorps anti-Pgp)	Beckman Coulter, Roissy, France
Verapamil	Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France
³ H-Vinblastine	GE healthcare, Orsay, France
³ H-Vincristine	GE healthcare, Orsay, France

Tableau 11 : Liste des produits chimiques, anticorps, milieux de culture, tampons utilisés, ainsi que leur provenance (Fournisseur, ville, pays)

1-2- Equipements

Equipements	Fournisseurs
Bain-marie universel	Grant, Polylabo, Starsbourg, France
Centrifugeuse 5415R	Eppendorf, Le Pecq, France
Centrifugeuse GR4i	Jouan, Saint-Herblain, France
Compteur à scintillation liquide 1214 Rackbeta	Wallac, Freiburg, Allemagne
FACS Calibur	Becton Dickinson, Le-Pont-De-Claix, France
Hotte à flux laminaire MSC12	Jouan, Saint-Herblain, France
iCycler	Biorad, Hercules, Etats-Unis
Incubateur CO ₂	Binder, Tuttlingen, Allemagne
Microscope CKX41	Olympus, Hambourg, Allemagne
Spectromètre de masse API 3000	Applied Biosystems, Foster city, Etats-Unis
Spectromètre de masse Quantum Discovery	Thermo-Fisher Scientific, Waltham, Etats-Unis
Système chromatographie liquide 1100	Agilent Technology, Les Ulis, France

Tableau 12 : Liste des équipements utilisés, ainsi que leur provenance (Fournisseur, ville, pays)

1-3- Logiciels

Logiciels	Fournisseurs
Analyst version 1.4.2	Applied Biosystems, Foster city, Etats-Unis
BD CellQuest™	Becton Dickinson, Le-Pont-De-Claix, France
Excalibur version 1.3	Thermo Finnigan, Waltham, Etats-Unis
GraphPad Prism®, Version 3.02	GraphPad Software Inc., San Diego, Etats-Unis
Microsoft® Office Excell 2003	Microsoft Corporation, Redmond, Etats-Unis
Microsoft® Office PowerPoint 2003	Microsoft Corporation, Redmond, Etats-Unis
Microsoft® Office Word 2003	Microsoft Corporation, Redmond, Etats-Unis
Reference Manager version 11	Thomson ResearchSoft, Carlsbad, Etats-Unis
WinMDI version 2.9	Scripps Research Institute, Californie, Etats-Unis

Tableau 13 : Liste des logiciels utilisés, ainsi que leur provenance (Fournisseur, ville, pays)

2- Cellules

2-1- Cellules endothéliales cérébrales fœtales humaines (HBMECs)

Les cellules endothéliales cérébrales fœtales sont des cultures primaires humaines et proviennent des laboratoires Sciencell. Elles sont cultivées et maintenues par passage successifs dans 20 ml de milieu de culture pour cellules endothéliales contenant 10 % de SVF, de la pénicilline (10 000 U/ml), de la streptomycine (10 000 µg/ml), ainsi que des facteurs de croissance pour cellules endothéliales (selon les recommandations du fournisseur), dans des flacons de culture en polystyrène de 75 cm². Elles sontensemencées à une densité de 7500 cellules/cm². Les flacons de culture sont déposés dans une étuve dont l'atmosphère est régulée en dioxyde de carbone (5%), en température (37°C) et en hygrométrie (95%).

2-2- Cellules mononucléées du sang périphérique (CMSPs)

Les échantillons de sang de donneurs sains proviennent de l'Etablissement Français du Sang (Rungis, France) et les CMSPs sont isolés par centrifugation sur gradient de Ficoll Histopaque-1077®. Les cellules sont lavées trois fois par du milieu RPMI-1640, les globules rouges sont lysées par un tampon contenant des sels d'ammonium (chlorure d'ammonium 140 g/l + carbonate d'ammonium 1.44 g/l). Les cellules sont utilisées fraîches et sont cultivées dans du milieu RPMI-1640 contenant 10% de SVF décomplémenté, 2 mM de L-glutamine, 50 µg/ml de pénicilline, 50 µg/ml de streptomycine et 100 µg/ml de néomycine, à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% CO₂.

3- Modèle *in vitro* de barrière hémato-encéphalique humaine

3-1- Obtention du tissu cérébral

Le modèle *in vitro* de BHE conçu au laboratoire est composé de deux types cellulaires, les cellules endothéliales cérébrales et les cellules gliales. Les prélèvements de tissus cérébraux humains non tumoraux proviennent d'institutions hospitalières parisiennes (France). Ils sont immergés immédiatement dans un milieu de conservation stérile supplémenté de pénicilline / streptomycine / néomycine et sont conservés à 4°C. Les mises en culture sont réalisées dans les huit heures qui suivent l'intervention.

3-2- Isolement et culture des cellules endothéliales cérébrales et des cellules gliales

La méthode d'isolement est basée sur celle précédemment décrite par les Dr Roux et Deli (Roux *et al.*, 1989 ; Deli et Joo, 1996). A la suite de digestions enzymatiques successives, les capillaires cérébraux et les cellules gliales sont isolés et mis en culture.

Les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines sont cultivées et maintenues par passages successifs dans du milieu EMB-2 contenant 5% de SVF décomplémenté, 1% de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), 0.4% d'hydrocortisone, 1% de R³-IGF-1 (Recombinant Long R insulin-like growth factor 1), 1% d'acide ascorbique, 4% de rhFGF-B (recombinant human basic Fibroblast Growth Factor), 1% de rhEGF (recombinant human Epidermal Growth Factor), 50 mg/ml gentamicin/ml et 50 ng/ml amphotéricin-B (GA-1000), à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂.

Les cellules gliales sont cultivées et maintenues par passages successifs dans du milieu MEM/F12 (50/50, v/v) contenant 5% de SVF décomplémenté, 1% de sérum humain décomplémenté, 1% de FGFb (basic Fibroblast Growth Factor), 50 µg/ml de pénicilline, 50 µg/ml de streptomycine et 100 µg/ml de néomycine, à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂.

3-3- Caractérisation des cellules

3-3-1- Immunophénotypage en microscopie à fluorescence

Des Labteks (Nunc) sontensemencées à raison de 10⁵ cellules par chambre dans 500 µl de milieu de culture. Une fois à confluence, les cellules sont rincées avec du PBS.

Si le marquage est cytoplasmique, les cellules sont préalablement perméabilisées et fixées avec du CytoFIX/CytoPERM™. Après 20 minutes d'incubation à 4°C, les cellules sont rincées avec du PermWash™ dilué au 1/10.

Les sites non spécifiques sont ensuite saturés par 300 µl de sérum humain décomplémenté. L'anticorps [anti-CD31 pour les cellules endothéliales et anti-GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) pour les cellules gliales], est mis en contact avec les cellules pendant 30 minutes à 4°C. Après rinçage, le 2^{ème} anticorps couplé au FITC (fluorescéine isothiocyanate) est ajouté et incubé pendant 30 minutes à 4°C. Puis les cellules sont rincées avec du PermWash™ dilué au 1/10.

Une coloration des noyaux au DAPI (4',6-diamidine-2-phénylindole) 1µg/ml est réalisée pendant 10 minutes à 4°C. Le DAPI ($\lambda_{\text{excitation}} = 372 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 456 \text{ nm}$) se fixe à l'ADN de façon spécifique formant des complexes ADN-DAPI fluorescents.

Suite aux différents marquages, les séparations délimitant les chambres sont retirées, et un montage entre lame et lamelle est réalisé avec du liquide de montage puis fixé avec du vernis. La lame peut ainsi être observée au microscope à fluorescence.

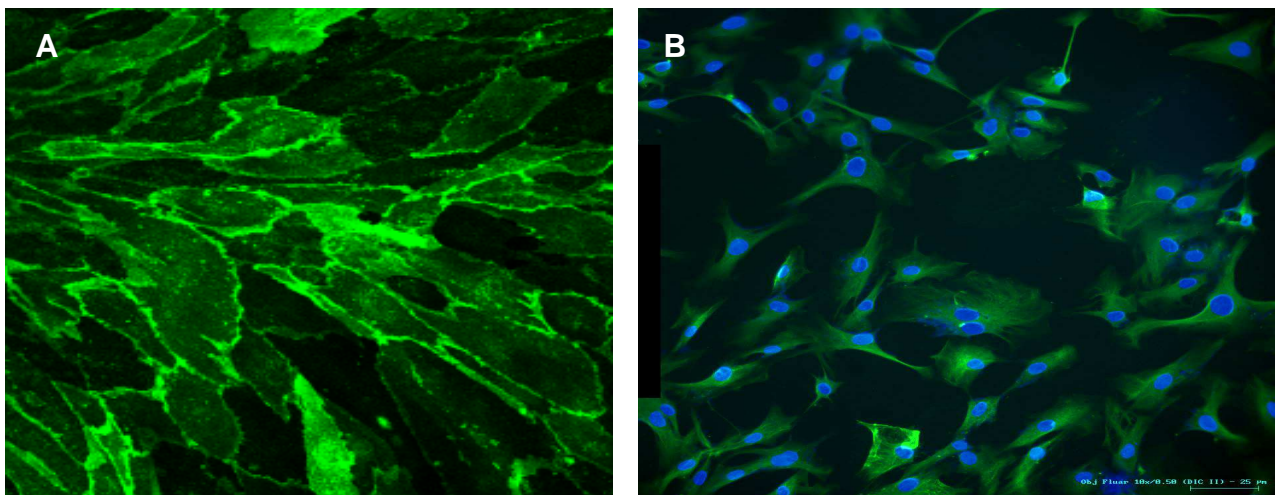


Figure 31 : A- Immunomarquage de cellules endothéliales cérébrales humaines marqués avec un anticorps anti-CD31 (Josserand *et al.*, 2006)
B- Immunomarquage de cellules gliales marquées avec un anticorps anti-GFAP et marquage des noyaux au DAPI (Josserand *et al.*, 2006)

3-3-2- Immunomarquage en cytométrie de flux

Après trypsinisation, les cellules sont fixées et perméabilisées dans du CytoFIX/CytoPERM™ (1 ml, 20 min, 4°C). Elles sont ensuite lavées et resuspendues dans du PermWash™ (1:10, 1 ml, 4°C).

100 µl de suspension cellulaire sont transférés dans un tube de 5 ml.

Pour les cellules endothéliales cérébrales, l'expression du marqueur CD31 est déterminée par incubation avec 10 μ l d'anticorps CD31:FITC ou avec 10 μ l de contrôle isotypique pendant 1 h à 4°C dans l'obscurité.

Pour les cellules gliales, l'expression de la GFAP est déterminée par incubation avec 10 μ l d'anticorps GFAP:FITC ou avec 10 μ l de contrôle isotypique pendant 1 h à 4°C dans l'obscurité.

Tous les échantillons sont ensuite lavés deux fois (1 ml de PBS supplémenté de 1% de BSA, 4°C), centrifugés (500 g, 5 min, 4°C) et analysés par cytométrie de flux.

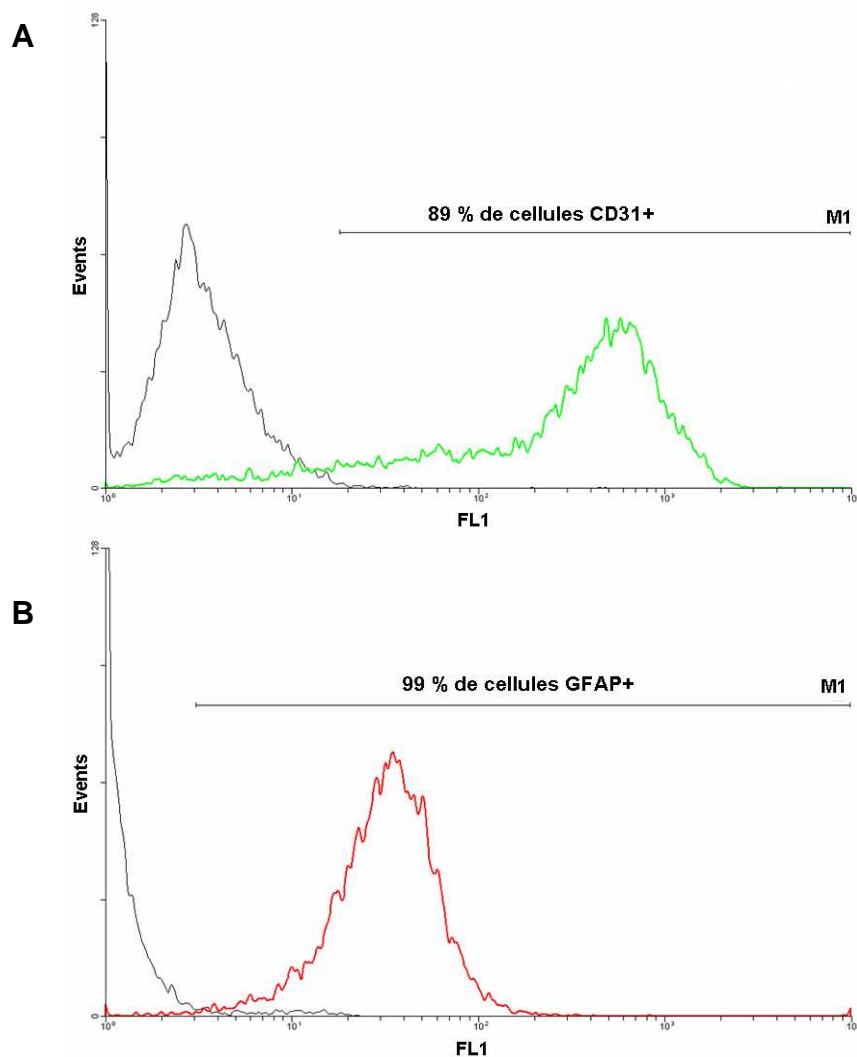


Figure 32 : Histogrammes représentant l'intensité de fluorescence des cellules en fonction du nombre d'événements

- A- Cellules marquées avec l'anticorps CD31:FITC (en vert) ou avec le contrôle isotypique (en noir). Ici, plus de 89% des cellules expriment le marqueur CD31.
- B- Cellules marquées avec l'anticorps GFAP:FITC (en rouge) ou avec le contrôle isotypique (en noir). Ici, plus de 99% des cellules expriment la GFAP.

3-4- Genèse du modèle *in vitro* de BHE

In vivo, la BHE est située au niveau de l'endothélium vasculaire cérébral, dont les cellules sont étroitement liées par des jonctions serrées, ce qui lui confère une forte résistance au passage du courant et limite les transports para-cellulaires. Ces cellules endothéliales cérébrales sont également caractérisées par un faible taux de pinocytose limitant les transports trans-cellulaires, ainsi qu'un fort niveau d'expression des transporteurs d'efflux. L'endothélium est en contact étroit avec les cellules gliales (astrocytes, péricytes, microglie), indispensables à l'acquisition des propriétés phénotypiques et fonctionnelles spécifiques de la BHE (Hawkins *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2006 ; Löscher et Potschka, 2005-a et b).

In vitro, afin de se rapprocher, le plus possible des conditions physiologiques, les cellules endothéliales sont cultivées sur des inserts (de porosité 0.4 µm) dans le compartiment apical (A), qui correspond au compartiment sanguin *in vivo*, en présence de cellules gliales du même donneur dans le compartiment basal (B), correspondant au parenchyme cérébral.

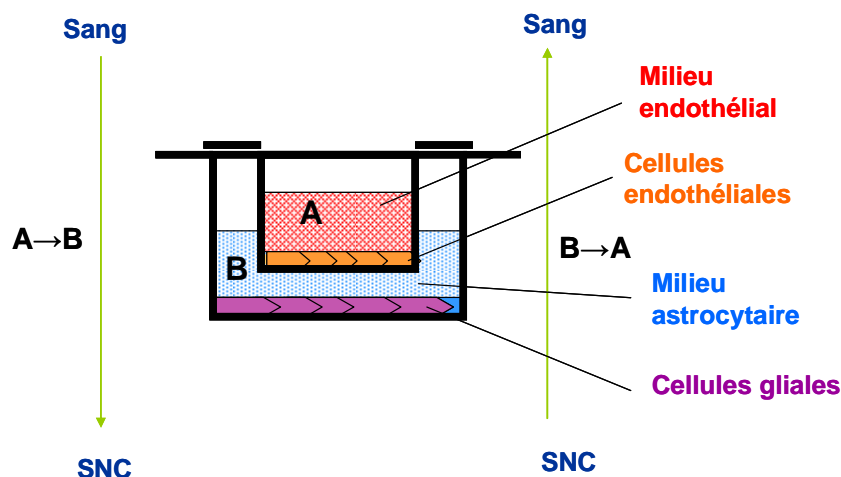


Figure 33 : Schéma représentant le modèle *in vitro* de BHE

3-5- Paramètres de validation du modèle

Afin de valider ce modèle *in vitro* de BHE, un certain nombre de paramètres ont été contrôlés : la présence de jonctions serrées, l'expression des transporteurs d'efflux (P-gp, MRP1 et BCRP), l'intégrité de la barrière.

3-5-1- Présence des jonctions serrées

Les protéines jonctionnelles (zonula occludens et claudine-5) sont mises en évidence grâce à des anticorps spécifiques. Le protocole d'immunomarquage est identique à celui décrit précédemment (paragraphe 3-3-1). Les cellules sont observées en microscopie confocale.

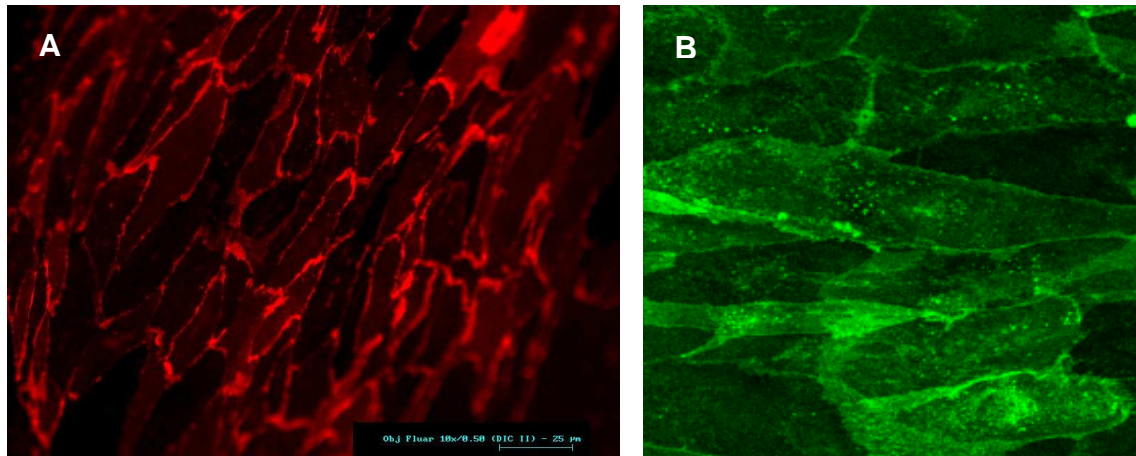


Figure 34 : Immunomarquage des protéines des jonctions serrées en microscopie confocale

A- Zonula Occludens

B- Claudine-5

3-5-2- Intégrité de la barrière

L'intégrité de la barrière est évaluée en mesurant le passage para-cellulaire d'un marqueur de référence [^{14}C]-sucrose.

Les inserts contenant les cellules endothéliales cérébrales sont transférés sur de nouvelles plaques sans cellules gliales. Les milieux apical et basal sont remplacés par un tampon de transfert (TB) contenant 150 mM de NaCl ; 5,2 mM de KCl ; 2,2 mM de MgCl_2 ; 6 mM de NaHCO_3 ; 2,8 mM de glucose et 5 mM d'Hepes (pH = 7,4). Le [^{14}C]-sucrose (12,95 MBq/ μmol) est immédiatement ajouté dans la chambre donneur (compartiment apical ou basal). A différents temps après l'addition du composé, des échantillons (100 μl) sont prélevés de la chambre accepteur (compartiment basal ou apical, respectivement) pour le comptage radioactif.

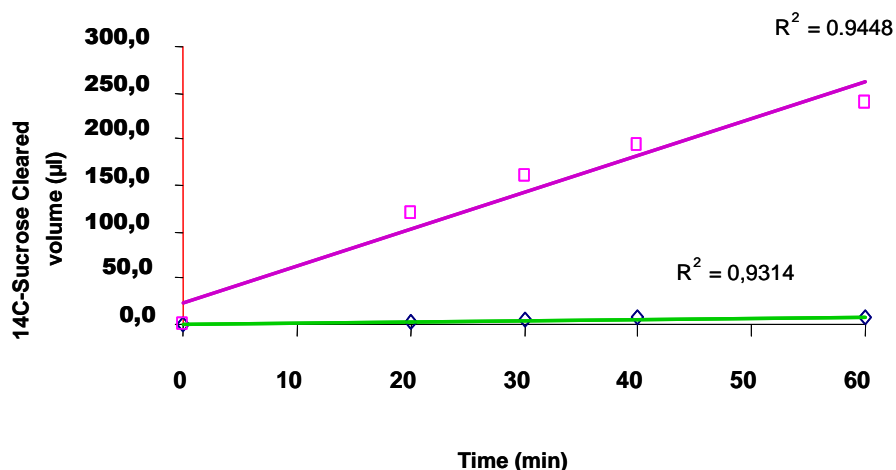


Figure 35 : Cinétique de passage du [^{14}C]-sucrose
 En rose : Contrôle (insert sans cellules)
 En vert : BHE-monocouche ($P_{st} = 0,1 \mu\text{l/min}$; $Pe = 1.67 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$)

3-5-3- Protéines d'efflux

Expression des transporteurs Pgp, MRP1 et BCRP

L'étude de l'expression des transporteurs est réalisée par immunomarquage direct en cytométrie de flux.

Les cellules endothéliales sont décollées et centrifugées (500 g, 5 min, 4°C). Elles sont fixées et perméabilisées dans du CytoFIX/CytoPERM™ (1 ml, 20 min, 4°C), puis lavées et resuspendues dans du PermWash™ (1:10, 1 ml, 4°C).

100 µl de chaque suspension cellulaire sont transférés dans un tube de 5 ml. L'expression de la Pgp est déterminée par incubation avec 20 µl d'anticorps UIC2:PE (spécifique de la Pgp humaine, Meaden *et al.*, 2002) et avec 20 µl de contrôle isotypique IgG2a pendant 1 h à 4°C dans l'obscurité. L'expression de la MRP1 est déterminée par incubation avec 10 µl d'anticorps QCRL:rPE (spécifique de la MRP1 humaine, Ferneti *et al.*, 2001) et avec 10 µl de contrôle isotypique IgG1 pendant 1 h à 4°C dans l'obscurité. L'expression de la BCRP est déterminée par incubation avec 10 µl d'anticorps anti-ABCG2:rPE (spécifique de la BCRP humaine) et avec 10 µl de contrôle isotypique IgG2a pendant 1 h à 4°C dans l'obscurité. Tous les échantillons sont ensuite lavés deux fois (1 ml de PBS supplémenté de 1% de BSA, 4°C), centrifugés (500 g, 5 min, 4°C) et analysés par cytométrie de flux.

Polarité de la barrière

La spécificité des cellules endothéliales est qu'elles expriment des transporteurs différents sur la face luminale par rapport à la face abluminale. Cette polarité a donc été vérifiée dans le modèle *in vitro* de BHE humain, par le passage d'un substrat spécifique de la Pgp, la [^3H]-digoxine.

Une cinétique sur 60 minutes est réalisée. Les cellules gliales sont retirées du compartiment basal. Les milieux apical et basal sont remplacés par du tampon TB. Le substrat, [^3H]-digoxine ($3,7 \times 10^3$ Bq/ml) est ajouté dans le compartiment apical ou basal. A différents temps après l'addition du substrat, des échantillons (100 μl) sont prélevés du compartiment basal ou apical, pour le comptage radioactif. Le quotient des coefficients de perméabilité (basal vers apical vs apical vers basal) est calculé. Si ce coefficient est supérieur à 2, le transport est polarisé, la Pgp est bien fonctionnelle sur les barrières.

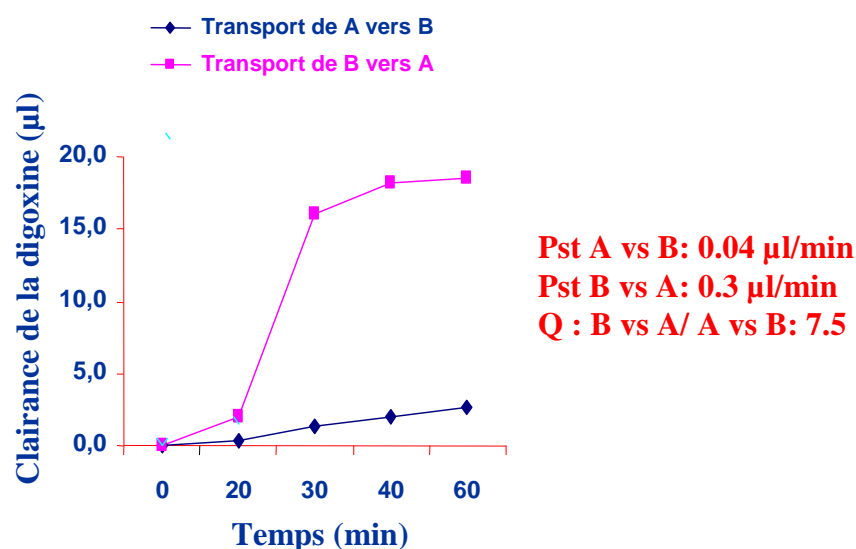


Figure 36 : Efflux de la [^3H]-digoxine au niveau du modèle de BHE *in vitro*

4- Interaction des antirétroviraux avec les cellules

4-1- Traitement des cellules

Les inhibiteurs de la protéase du VIH (atazanavir, ritonavir, lopinavir) et l'efavirenz sont solubilisés dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). L'emtricitabine et le ténofovir sont solubilisés dans de l'eau déminéralisée stérile. Les solutions mères (100 mM) sont stockées à -20°C . La concentration finale de DMSO dans le milieu de culture est toujours inférieure à 1% pour respecter la viabilité cellulaire et éviter toute interférence du DMSO avec les paramètres mesurés.

4-1-1- Les cellules mononucléées du sang périphérique (CMSPs)

Les CMSPs sontensemencées à raison d'environ 5 millions de cellules par puits de polystyrène de surface 1.9 cm^2 dans des plaques 24 puits pour cellules en suspension Greiner®, contenant 1 ml de

milieu RPMI-1640 complet. Les cellules sont incubées avec les différents antirétroviraux seuls ou bien associés :

- Ritonavir (RTV) 1 μ M
- Lopinavir (LPV) 5 μ M
- Atazanavir (ATV) 5 μ M
- Emtricitabine (FTC) 5 μ M
- Tenofovir (TFV) 5 μ M
- Efavirenz (EFV) 5 μ M

Les concentrations utilisées sont proches des concentrations plasmatiques des patients traités par ces médicaments, et n'excèdent pas la solubilité maximale décrite par Storch *et al.*, 2007. La concentration de DMSO est ajustée dans chaque puits à 0.22%.

Les cellules sont alors incubées pendant 20 ou 72 heures à 37°C, sous 5% de CO₂ et 95% d'hygrométrie.

4-1-2- Les cellules endothéliales cérébrales fœtales humaines (HBMECs)

Les cellules sontensemencées à 70 000 par puits pour les plaques 6 puits Greiner®, et 14 000 par puits pour les plaques 24 puits Greiner®. A confluence, elles sont incubées dans du milieu endothélial complet avec du DMSO 0.2% ou bien de l'atazanavir 5 μ M, pendant 20 heures à 37°C, sous 5% de CO₂ et 95% d'hygrométrie.

4-2- Influence des antirétroviraux sur la régulation des transporteurs d'efflux in vitro

4-2-1- Etude de l'expression des ARN messagers des transporteurs

L'étude de l'expression des ARN messagers des transporteurs est réalisée par RT-PCR en temps réel. Les ARN des CMSPs (5 ou 10 x 10⁶ cellules) sont isolés grâce au kit *GenElute™ mammalian total RNA*. La concentration et la pureté des ARN sont ensuite déterminées en mesurant l'absorbance à 260 et à 280 nm. Le ratio DO₂₆₀ / DO₂₈₀ est compris entre 1,8 et 2. Une quantité de 0,5 μ g d'ARN est rétro-transcrite en ADN complémentaire avec des amorces aléatoires, en utilisant le kit *RT² First Strand*. L'ADNc est dilué dans de l'eau distillée ultrapure jusqu'à un volume de 100 μ l. 2 μ l sont distribués sur une plaque *RT² Profiler PCR Array* pour chaque paire d'amorces spécifiques, en suivant les recommandations du fournisseur. Les amorces utilisées pour l'analyse sont celles des gènes *abcb1* (codant pour la Pgp), *abcc1*, *abcc2*, *abcc3*, *abcc4*, *abcc5*, *abcc6* (codant pour les MRPs 1 à 6), *abcg2* (codant pour la BCRP), *slc22A6* et *slc22A8* (codant pour les OAT 1 et 3).

L'expression relative des gènes entre les échantillons traités et non traités est déterminée selon les règles suivantes.

Pour chaque échantillon, une différence de cycles de PCR (C_T) est calculée entre le gène de référence et le gène d'intérêt : ΔC_T . Les gènes de référence sont ceux de la *GAPDH* (Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) et de la *HPRT* (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase). Ils sont choisis de façon à ce que leur C_T soit le plus proche possible de celui du gène d'intérêt.

Pour chaque paire d'échantillons (traités et contrôle non traités), une différence de ΔC_T est calculée : $\Delta\Delta C_T$ [$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ (échantillon traité) - ΔC_T (échantillon contrôle)]. Enfin, le changement d'expression entre les échantillons traités et non traités peut être exprimé par $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

4-2-2- Etude de l'expression protéique des transporteurs

L'étude de l'expression protéique des transporteurs est réalisée par immunomarquage direct en cytométrie de flux.

Après traitement avec les ARV, les cellules sont centrifugées (500 g, 5 min, 4°C). Elles sont ensuite soit fixées dans du CellFIX™ (1:10, 1 ml, 4°C), soit fixées et perméabilisées dans du CytoFIX/CytoPERM™ (1 ml, 20 min, 4°C). Les cellules sont ensuite lavées et resuspendues dans du PBS (1 ml, 4°C) ou du PermWash™ (1:10, 1 ml, 4°C), respectivement.

100 µl de chaque suspension cellulaire sont transférés dans un tube de 5 ml. L'expression de la Pgp est déterminée par incubation avec 20 µl d'anticorps UIC2:PE (spécifique de la Pgp humaine, Meaden *et al.*, 2002) et avec 20 µl de contrôle isotypique IgG2a pendant 1 h à 4°C dans l'obscurité. L'expression de la MRP1 est déterminée comme précédemment par incubation avec 10 µl d'anticorps QCRL:rPE (spécifique de la MRP1 humaine, Fernetti *et al.*, 2001) et avec 10 µl de contrôle isotypique IgG1 pendant 1 h à 4°C dans l'obscurité. Tous les échantillons sont ensuite lavés deux fois (1 ml de PBS supplémenté de 1% de BSA, 4°C), centrifugés (500 g, 5 min, 4°C) et analysés par cytométrie de flux.

4-2-3- Etude de la fonctionnalité des transporteurs

L'étude de la fonctionnalité des transporteurs est réalisée par un test d'accumulation de la calcéine acétoxyméthylester (calcéine-AM), en présence ou en absence d'inhibiteur spécifique des transporteurs.

La calcéine-AM est une sonde fluorogénique hautement lipophile qui pénètre rapidement à travers la membrane plasmique. Dans la cellule, des estérases endogènes la transforment en calcéine fluorescente et hydrophile, qui ne peut pas traverser la membrane plasmique (Hollo *et al.*, 1996). La calcéine-AM est substrat de la Pgp et des MRPs, alors que la calcéine ne l'est pas. L'activité de transport de la Pgp et des MRPs est inversement proportionnelle à l'accumulation de calcéine

fluorescente, l'inhibition de ces transporteurs entraîne une augmentation de la fluorescence cellulaire (Weiss *et al.*, 2003). La cyclosporine A à la concentration de 2 μ M est un inhibiteur spécifique de la Pgp (Legrand *et al.*, 1998), le verapamil est un inhibiteur non spécifique de la Pgp et des MRPs (Janneh *et al.*, 2005), et le MK571 est un inhibiteur spécifique des MRPs (Gekeler *et al.*, 1995).

Après leur traitement avec les différentes combinaisons thérapeutiques, les cellules sont lavées avec du PBS froid, puis incubées avec 0.1 μ M de calcéine-AM pendant 30 min à 37°C dans 1 ml de milieu RPMI avec ou sans inhibiteur (2 μ M de cyclosporine A, 30 μ M de verapamil ou 30 μ M de MK571). Elles sont ensuite lavées deux fois avec du PBS froid, puis fixées avec du CellFIX (1:10, 400 μ l, 4°C) et analysées par cytométrie de flux.

4-2-4- Analyse en cytométrie de flux

Les analyses sont effectuées sur un cytomètre de flux, FACS Calibur (Becton Dickinson). La taille (Forward scatter : FSC) et la granulosité / réfringence des cellules (Side Scatter : SSC) sont détectées sur un *dot plot* à échelle linéaire. La fluorescence des cellules est détectée sur un histogramme à échelle logarithmique. Pour l'analyse des CMSPs, les lymphocytes sont sélectionnés électroniquement à partir de la population totale de CMSPs, en collectant 10 000 événements pour chaque échantillon. La localisation des sous-populations cellulaires (lymphocytes CD4, CD8 et monocytes) a été vérifiée par immunomarquage direct en utilisant respectivement des anticorps CD4:FITC, CD8:PC5 et CD11b:FITC, et leurs contrôles isotypiques (figure 36).

En ce qui concerne l'acquisition de données, le logiciel WinMDI version 2.9 (Scripps Research Institute, California, USA) est utilisé pour déterminer les moyennes géométriques de fluorescence (Gmean) sur les canaux FL1 ou FL2 suivant le fluorochrome.

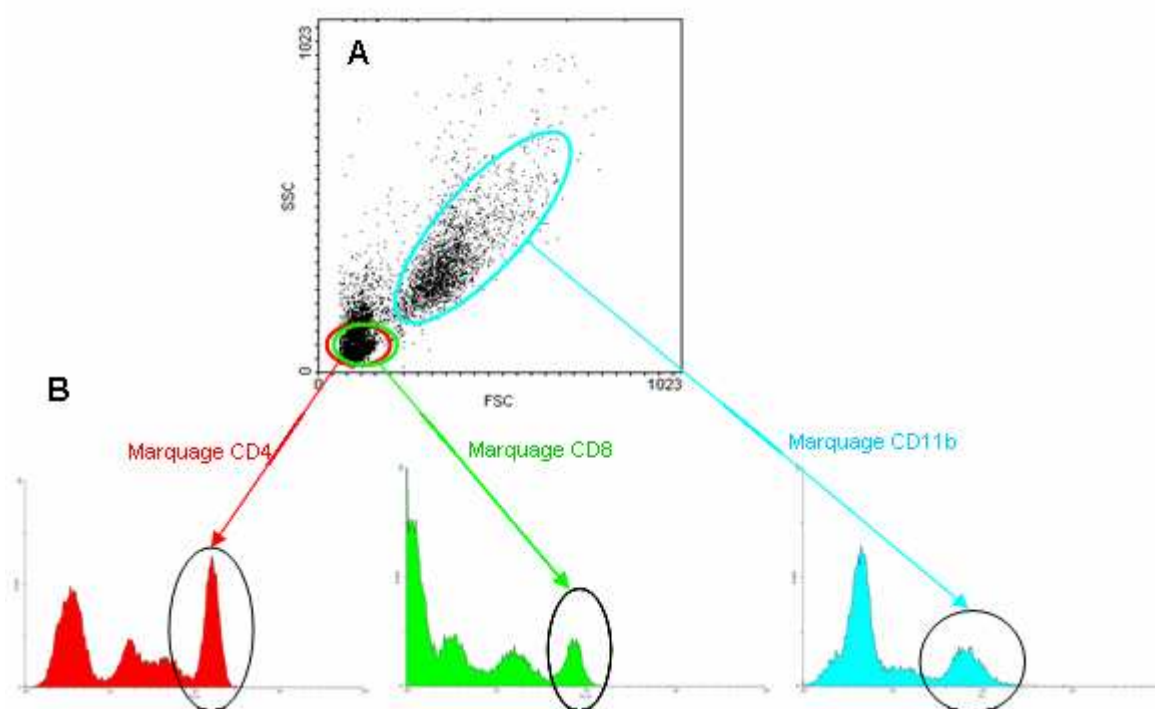


Figure 37 : Mise en évidence des différents types cellulaires présents dans les CMSPs.
 A- Graphe représentant la granulométrie (SSC) en fonction de la taille (FSC) des cellules.
 B- Histogramme des cellules marquées avec un anticorps anti-CD4 (rouge), anti-CD8 (vert) ou bien anti-CD11b (bleu)

Etude de l'expression des transporteurs

Les résultats ont été obtenus sous forme d'histogramme à échelle logarithmique monoparamétrique représentant l'intensité de fluorescence de l'anticorps anti-Pgp ou anti-MRP1 en fonction du nombre de cellules analysées (figure 37). Le marquage non spécifique a été déterminé sur les cellules incubées en présence du contrôle isotypique. Un marqueur de positivité (M1) a ainsi été placé à droite du pic de fluorescence.

Les variations d'expression des transporteurs sur les histogrammes sont analysées en réalisant un calcul de Gmean (moyenne géométrique) relatif au pic isotypique :

Gmean relatif = (Gmean des cellules marquées - Gmean du contrôle isotypique) / Gmean contrôle isotypique

Gmean, étant la moyenne géométrique des pics de fluorescence.

Cette valeur obtenue pour les cellules traitées est ensuite comparée à celle obtenue pour les cellules non traitées (0.22% DMSO) :

Pourcentage d'expression = $100 - ((\text{Gmean relatif des cellules traitées} - \text{Gmean relatif des cellules non traitées}) / \text{Gmean relatif des cellules non traitées}) \times 100$.

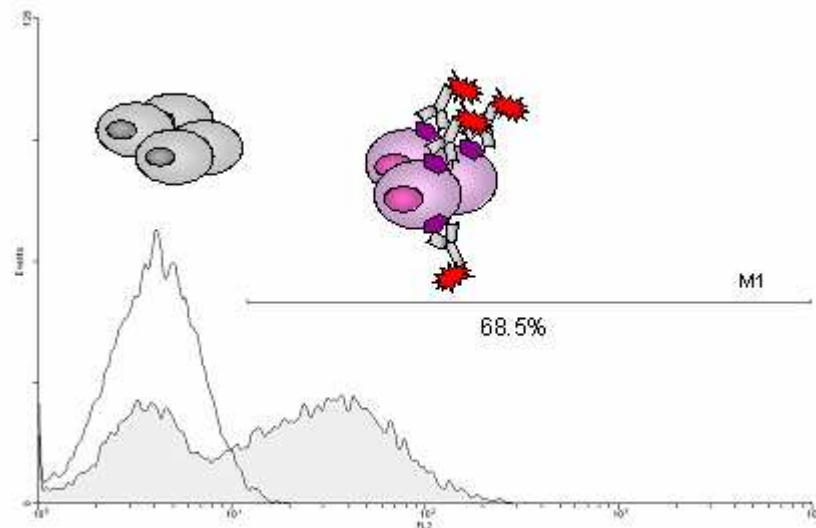


Figure 38 : Expression de la P-glycoprotéine dans les lymphocytes totaux : histogramme représentant l'intensité de fluorescence de la sous-population lymphocytaire en fonction du nombre d'événements, détecté sur le canal 2 (FL2). Les cellules marquées avec l'anticorps anti-Pgp sont en gris et les cellules marquées avec le contrôle isotypique sont en blanc. Ici, 68.5% des lymphocytes expriment la Pgp.

Etude de la fonctionnalité des transporteurs

La fluorescence due à la calcéïne est suivie sur le canal 1 (FL1) sur une population lymphocytaire électroniquement sélectionnée. La fonctionnalité du transporteur est quantifiée par l'équation suivante (Rautio *et al.*, 2006) :

$$\text{Percentage activity (\%)} = 100 - \frac{\text{Gmean}_{\text{calcein}}}{\text{Gmean}_{\text{inhibitor}}} \times 100$$

où $\text{Gmean}_{\text{calcein}}$ est la moyenne géométrique de fluorescence des cellules avec la calcéïne et $\text{Gmean}_{\text{inhibitor}}$ est la moyenne géométrique de fluorescence des cellules avec la calcéïne en présence d'inhibiteur (2 μM cyclosporine A, 30 μM verapamil ou 30 μM MK571).

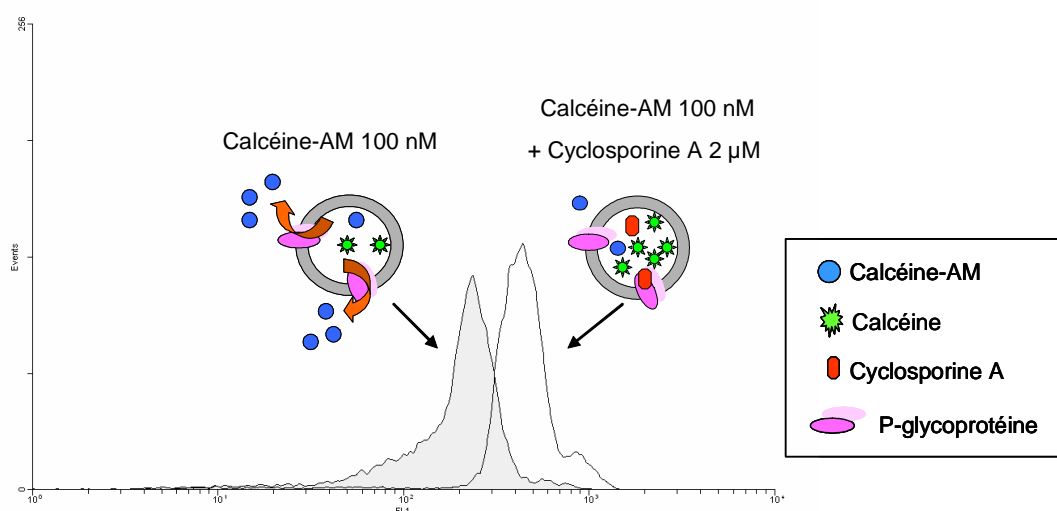


Figure 39 : Fonctionnalité de la P-glycoprotéine dans les lymphocytes totaux : histogramme représentant l'intensité de fluorescence de la sous-population lymphocytaire en fonction du nombre d'événements, détecté sur le canal 1 (FL1). Les cellules ayant incorporé la calcéine-AM sont en gris. Les cellules avec la calcéine-AM et dont l'efflux est inhibé par la cyclosporine A sont en blanc.

4-3- Influence des transporteurs d'efflux sur l'accumulation intracellulaire des antirétroviraux *in vitro*

Les méthodes de dosage des antirétroviraux ont été adaptées de méthodes déjà utilisées et validées au laboratoire, pour le FTC, le TFV et l'EFV (Pruvost *et al.* 2006, 7th International Workshop on clinical Pharmacology of HIV Therapy, Lisbon, Portugal) et pour le RTV, le LPV et l'ATV (Pèlerin *et al.*, 2005).

4-3-1- Préparation des solutions stocks et diluées

Les solutions stocks d'étalon interne 2-chloroadénosine (2CADO) à 1 mg/ml et de kétoconazole à 5 mg/ml, sont préparées respectivement dans de l'eau ultrapure et du méthanol, et sont stockées à -20°C. Les solutions intermédiaires d'antirétroviraux et d'étalons internes sont préparées par dilution successives à partir des solutions stocks, dans de l'eau ultrapure (FTC, TFV, 2CADO) ou du méthanol (EFV, IPs, kétoconazole) et sont stockées à -20°C. Les solutions de travail d'étalon interne (50 ng/ml) sont préparées quotidiennement dans un mélange Tris-HCl (0.05M, pH 7.4) / méthanol : 30/70 (v/v).

4-3-2- Méthodologie analytique pour le dosage de FTC, TFV, EFV

La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne Phenomenex Synergi Polar-RP 4 μ m 50 x 2 mm thermostatée à 40°C avec une phase mobile contenant 0.5% d'acide formique et un gradient de méthanol délivré à un débit 300 μ l/min de 2 à 80% en 4 min, suivie d'une période d'équilibration de 4 minutes à 2% de méthanol. La détection en spectrométrie de masse a été réalisée sur un Quantum Discovery avec une source ESI (Thermo-Fisher Scientific), et analysée grâce au logiciel d'acquisition et de traitement des données Excalibur version 1.3. (Thermo-Finnigan). Les paramètres du spectromètre, optimisés pour l'ionisation et la détection, sont comme suit dans le tableau 14.

	FTC	TFV	2CADO	EFV	2CADO
Mode de spectrométrie	+	+	+	-	-
Tension du capillaire	3.5 kV			3 kV	
Pression de gaz du capillaire	30			40	
Pression du gaz auxiliaire	5			24	
Température du capillaire	320°C			330°C	
Energie de collision de la source CID	12				
Pression du gaz de collision	1,6 mTorr				
Energie de collision	15 eV	28 eV	21 eV	18 eV	28 eV
m/z de l'ion parent	248.04	288.06	302.06	313.6	299.6
m/z de l'ion fils	130.09	176.24	170.06	244.0	132.06
Temps de rétention	1,9	1.2	3,9	6.64	3.92
Limite de quantification	0,5 ng/ml	0,5 ng/ml	nd	0.5 ng/ml	nd

Tableau 14 : Paramètres d'optimisation du spectromètre de masse

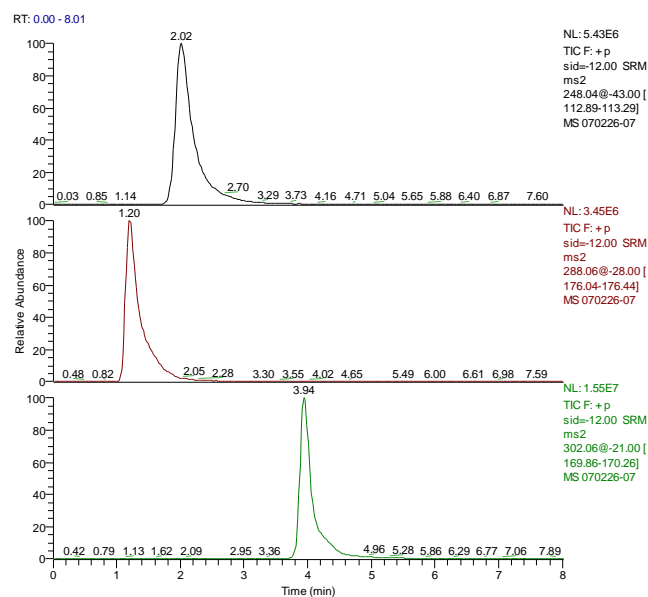


Figure 40 : Chromatogramme d'une solution standard de tenofovir (en rouge), emtricitabine (en noir) et 2CADO (étalon interne, en vert). Le ténofovir et l'emtricitabine sont à 70 ng/ml et la 2CADO à 50 ng/ml.

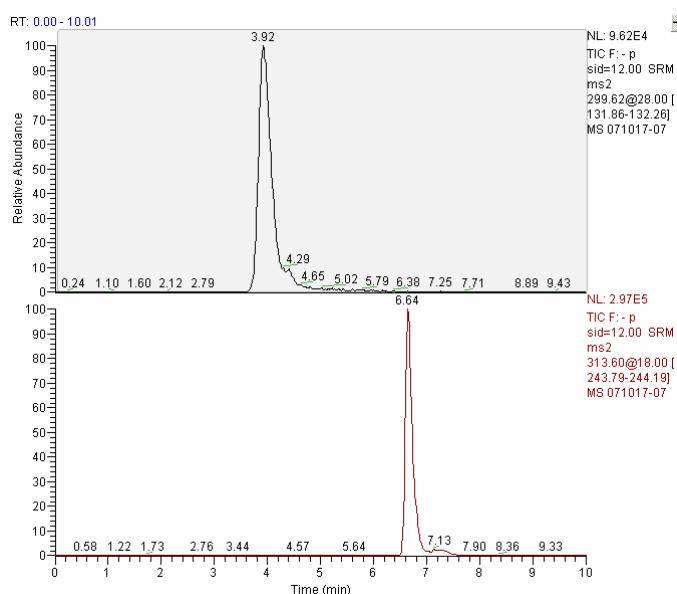


Figure 41 : Chromatogramme d'une solution standard d'efavirenz (en rouge) et 2-CADO (étalon interne, en noir). L'efavirenz est à 80 ng/ml et la 2CADO à 50 ng/ml.

4-3-3- Méthodologie analytique pour le dosage des IPs

La séparation chromatographique a été réalisée sur un système 1100 (Agilent Technology), thermostaté à 40°C, avec une phase mobile contenant 10 mM acétate d'ammonium + 0.1% acide acétique et un gradient d'acétonitrile, délivrée à un débit de 1 ml/min. La colonne analytique est une

Nova Pack C18 60Å, 4 µm, 150 mm x 3.9 mm (Waters) avec une pré-colonne, Modulacart cartridge 10 mm x 2 mm (Interchim). La méthode étant réduite à 4 molécules (RTV, LPV, ATV et kétoconazole), le gradient de séparation a été réduit à 10 minutes, à la place de 20 minutes (Tableau 15). La détection en spectrométrie de masse est réalisée sur un triple quadripôle API 3000 avec une source ESI (Applied Biosystems)..

Temps	%A	%B
Initial	70	30
A 1 min	70	30
A 5 min	30	70
A 6 min	0	100
A 7 min	0	100
A 8 min	70	30
A 10 min	70	30

Tableau 15 : Gradient d'élution pour la quantification des IPs par LC-MS/MS

A = 10% acetonitrile + 90% 10 mM ammonium acetate avec 0.1% acetic acid;

B = 90% acetonitrile + 10% 10 mM ammonium acetate avec 0.1% acetic acid

La détection en spectrométrie de masse est réalisée sur un triple quadripôle API 3000 équipé d'une source d'ionisation de type electrospray (ESI) (Applied Biosystems). Les données sont traitées par le logiciel Analyst 1.4.2 (Perkin Elmer). Toutes les molécules sont analysées en mode positif. Le débit est divisé par trois à l'entrée du spectromètre, par une union en forme de T (PEEK tubing splitter, 0.13 mm de diamètre interne, Interchim). Les paramètres du spectromètre, optimisés pour l'ionisation et la détection, sont comme suit dans le tableau 16.

	LPV	RTV	ATV	kétoconazole
Mode de spectrométrie	+	+	+	+
Tension du capillaire	+ 5,5 kV			
Declustering potential	50 V	60 V	60 V	60 V
Température de la source	550°C			
Energie de collision	20 eV	27 eV	40 eV	40 eV
m/z de l'ion parent	629,6	721,4	705,4	531,3
m/z de l'ion fils	447,4	296,3	335,6	489,2
Temps de rétention	7,09	6,68	6,34	6,33
Limite de quantification	0,5 ng/ml	0,5 ng/ml	0,5 ng/ml	nd

Tableau 16 : Paramètres d'optimisation du spectromètre de masse

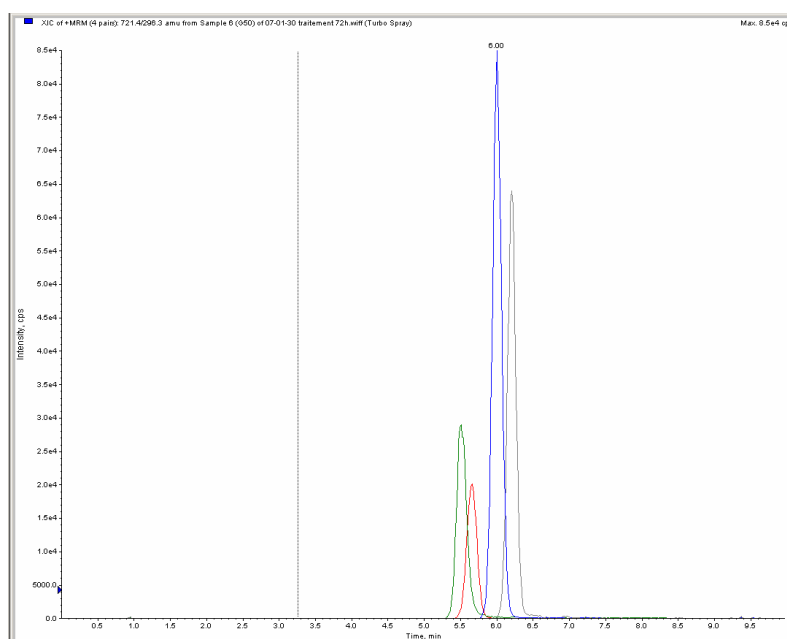


Figure 42 : Chromatogramme d'une solution standard de ritonavir (bleu), d'atazanavir (rouge), de lopinavir (gris) et de kétoconazole (vert) (étalon interne). Toutes les molécules sont à 50 ng/ml.

4-3-4- Préparation des échantillons (standards, contrôles qualité, échantillons)

Les standards et les contrôles qualité (QCs) sont préparés comme suit : des solutions de FTC, TFV, EFV, RTV, LPV, ATV à la concentration souhaitée sont ajoutés à un culot de CMSPs non traités (5 ou 10×10^6 cellules). Pour le dosage de FTC et TFV, les concentrations finales de médicaments sont 0.5, 1.0, 10, 70, 130, 190 and 250 ng / échantillon pour les standards, et 1.5, 120 and 200 ng / échantillon pour les QCs. Pour le dosage de l'EFV, les concentrations finales sont 1, 2, 20, 80, 140, 200, 260, 320, 400 ng / échantillon pour les standards, et 3, 180 and 340 ng / échantillon pour les QCs. Pour le dosage des IPs, les concentrations finales sont 1, 2, 10, 50, 100, 300 et 500 ng / échantillon pour les standards, et 3, 75, 250 ng / échantillon pour les QCs. Un millilitre d'un mélange Tris-HCl (0.05 M, pH 7.4) / méthanol : 30/70 (v/v) contenant le standard interne (2-CADO ou kétoconazole, suivant le dosage) à 50 ng/ml, est ajouté aux standards, QCs et échantillons.

Les analytes sont extraits des CMSPs (échantillons, QCs et standards) comme décrit précédemment (Pruvost *et al.*, 2001). Après une lyse mécanique des cellules, les tubes sont centrifugés (18000 g, 15 min, 4°C). Les surnageants sont transférés dans des tubes de polypropylène et évaporés à sec (TurboVap, Zymark, France). Les résidus sont repris dans 200 µl d'eau ultrapure pour la

quantification du FTC, TFV et EFV, et 200 μ l de Tris-HCl (0.05 M, pH 7.4) pour la quantification des IPs. 40 μ l de chaque solution sont injectés dans le système LC-MS/MS.

4-3-5- Comptage cellulaire

Les CMSPs de chaque échantillon sont comptées en utilisant un test biochimique validé au laboratoire (Benech *et al.*, 2004). Cette méthode est basée sur une relation directe entre le comptage cellulaire et le signal de fluorescence généré par l'incorporation de SYBr green dans l'ADN. Les concentrations intracellulaires sont calculées en assimilant le volume d'une cellule à 0.4 pl.

4-4- Accumulation d'un substrat radioactif, la [3 H]-vincristine

Les CMSPs de donneurs sains (5×10^6 cellules/ml) isolés comme décrit précédemment, sont incubés avec un inhibiteur des MRPs, le MK571 (30 μ M) comme contrôle positif, ou bien avec différentes concentrations de médicament (0.01 μ M à 100 μ M) pendant 30 min à 37°C dans 1 ml de milieu RPMI complet.

La vincristine est substrat des MRPs (Ozben, 2006). Son accumulation est proportionnelle à l'inhibition des MRPs. Elle commence par l'addition de [3 H]-vincristine (3.7×10^3 Bq par puits). Après 1 h d'incubation, les cellules sont centrifugées (500 g, 5 min, 4°C) et lavées avec du PBS froid. Elles sont ensuite lysées dans du Triton X-100 1% pendant 10 min (Menez *et al.* 2006). Quatre millilitres de scintillant Aqualuma Plus sont ajoutés pour le comptage de radioactivité. L'inhibition du transport de la [3 H]-vincristine est déterminée en mesurant l'augmentation de la radioactivité, traduisant l'accumulation de vincristine dans les cellules.

5- Analyse statistique

Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM (écart-type de la distribution des moyennes). GraphPad Prism® 3.0 est utilisé pour l'analyse statistique afin de mettre en évidence une différence significative entre les différents groupes. Cette significativité entre les groupes traités et le contrôle est évaluée par un test t de Student paramétrique, ou bien une analyse de variance simple (one-way ANOVA) avec un post-test de Dunett. Les différences sont considérées significatives quand p est inférieur à 0.05.

RÉSULTATS

Chapitre 1

Emtricitabine : Interaction avec les transporteurs d'efflux et conséquences sur l'accumulation des IPs dans les CMSPs

Ce travail a fait l'objet d'un article soumis dans *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (novembre 2007) et ayant pour titre :

Emtricitabine: Inhibitor and Substrate of MultiDrug Resistance Associated Protein

Il a également été présenté au congrès suivant :

11th European AIDS Conference, Madrid, 24-27 octobre 2007, Poster 3.2-02

1- Introduction

Cette étude s'est placée dans un contexte de combinaison thérapeutique anti-VIH, souvent administrée aux patients sous HARRT (thérapie antirétrovirale hautement active), associant l'emtricitabine (FTC) à des inhibiteurs de la protéase (lopinavir ou atazanavir, boosté par de faibles doses de ritonavir).

Lors d'une thérapie initiale, une molécule est choisie pour son potentiel antiviral, sa dose, son nombre de prise quotidienne, sa faible toxicité, son profil de résistance, ses interactions pharmacocinétiques et l'avis du patient. L'emtricitabine entre bien dans ces critères.

Le métabolite actif du FTC (le FTC triphosphate) a une longue durée de vie, supérieure à 39 h, ce qui permet de ne l'administrer qu'une fois par jour.

Des études cliniques associant ce médicament à un autre INTI comme le ténofovir, et deux IPs ou un INNTI, ont montré une efficacité antirétrovirale importante et un faible taux de résistance virale. Dans une étude évaluant la combinaison FTC, TDF, LPV/RTV (KaletraTM), la mutation K65R associée au TDFV n'a pas été observée après 48 semaines de traitement (Johnson *et al.*, 2006). Il en est de même pour une étude portant sur la combinaison FTC, TDF et EFV (Pozniak *et al.*, 2006). La mutation M184V associée à la résistance au FTC n'est observée que très rarement, sur 2 des 115 patients traités par TDF/FTC/LPV/rvt et sur 2 des 244 patients traités par TDF/FTC/EFV.

L'étude FTC-301A, comparant les effets de l'emtricitabine administré en une prise quotidienne et de la stavudine en 2 prises quotidiennes, a montré que le FTC avait un meilleur taux de réponse virologique à 48 semaines (78% vs 59%) (Saag *et al.*, 2004). Le régime contenant du FTC est également associé à un meilleur taux de HDL (high density lipoprotein) cholestérol (Saag, 2004).

Nous avons mené cette étude dans le but de mieux connaître les mécanismes de pharmacologie cellulaire associée au FTC, et son implication dans une association avec les IPs (RTV, LPV, ATV). Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'interaction du FTC avec les transporteurs d'efflux. En effet, comprendre la régulation de l'expression et de la fonctionnalité des protéines d'efflux par le FTC pourrait augmenter l'entrée et l'accumulation des autres antirétroviraux, et notamment les IPs, dans les cellules.

Dans ce travail, nous avons montré par RT-PCR que les CMSPs expriment de hauts niveaux d'ARN messagers des gènes *mdr1* (codant pour la Pgp) et *mrp1* (codant pour la MRP1). Nous avons rapporté que le FTC, à la concentration de 5 μ M, seul ou en combinaison avec des IPs (LPV/RTV ou ATV/RTV) ne modulent pas l'expression protéique de la Pgp et de la MRP1. En revanche, un traitement de 72h avec le FTC diminue la fonctionnalité de la MRP1. Cette inhibition n'est pas corrélée à une augmentation des concentrations des IPs.

Le MK571, mais pas la cyclosporine A entraîne une augmentation significative de l'accumulation intracellulaire de FTC. Le FTC provoque une augmentation concentration-dépendante de l'accumulation de deux substrats des MRPs (la calcéine-AM et la vincristine).

L'ensemble de ces résultats nous ont permis de conclure que le FTC a un double caractère, à la fois substrat et inhibiteur des MRPs.

ARTICLE 1

Emtricitabine: Inhibitor and Substrate of MultiDrug Resistance Associated Protein

European Journal of Pharmaceutical Sciences

Emtricitabine: Inhibitor and Substrate of MultiDrug Resistance Associated ProteinBousquet Laurence ^{a,b}, Pruvost Alain ^a, Didier Nathalie ^a, Farinotti Robert ^b, Mabondzo Aloïse ^a

a- iBiTec-S, Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse, CEA/Saclay, 91191 Gif sur Yvette, France; b- Pharmacie Clinique, EA 2706 Barrières et Passage des Médicaments, Université Paris Sud, XI, Faculté de Pharmacie, 92296 Châtenay-Malabry, France

Efflux proteins have been shown to greatly affect the uptake of antiretroviral drugs by cells and to prevent their access to the HIV-1 replication site. The active efflux of these drugs might produce subtherapeutic drug levels and favor resistant viral strains and the emergence of sanctuary sites.

This study has been performed to investigate whether emtricitabine (FTC) is a substrate and/or inhibitor of MRP1 in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs, HIV-1 target site). Moreover, we have reported the impact of FTC combined with protease inhibitors (PIs) (ritonavir, atazanavir, lopinavir) on Pgp and MRP1 expression and function, and on PI accumulation.

Following a 72-h incubation with antiretroviral regimen, Pgp and MRP1 expression and function were assessed on lymphocytes; and

intracellular drug concentrations were measured by LC-MS/MS. FTC concentrations were determined following incubation with or without specific efflux proteins inhibitors. FTC inhibitor properties were measured using 2 different MRP substrates.

Quantitative real-time PCR showed that PBMCs express high levels of both Pgp and MRP1 mRNA copy number whereas MRP2 and MRP3 were not detectable. Our findings indicate a decrease in MRP1 function after exposure to FTC. MK571 (specific MRP inhibitor) significantly increases FTC accumulation in PBMCs. FTC increases intracellular calcein and [3H]-vincristine accumulation.

Emtricitabine has both inhibitor and substrate characteristics with MRP1 in PBMCs in vitro, and does not interact with PI accumulation.

Currently available antiretroviral agents belong to four different classes: nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors (NRTIs, NtRTIs), non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), protease inhibitors (PIs), and a new class of fusion inhibitors (FIs). The combined administration of at least 3 drugs from different drug classes as highly active antiretroviral therapy (HAART) has been shown to slow the progression of diseases, improve survival, and result in better virologic and immunologic responses (Chearskul *et al.*, 2006). The effectiveness of HAART is challenged by viral resistance to antiretrovirals (ARV) and the frequent occurrence of drug interactions, which may limit the access of these drugs to the target sites (De Maat *et al.*, 2003).

Emtricitabine (FTC) has been described as a once daily NRTI that selectively and potentially inhibits HIV-1 replication (Molina and Cox, 2005). The efficiency of this drug depends on its intracellular accumulation and phosphorylation level at the major site of HIV replication (*i.e.* peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) and its capacity to cross physiological barriers (*i.e.* epithelial barrier, blood-brain barrier). Both processes depend on the activation level of target cells and probably the ability of FTC to interact with efflux proteins (ABC transporters) such as P-glycoprotein (Pgp) and

multidrug resistance-associated proteins (MRPs) expressed on CD4+ cells (Chaudhary *et al.*, 1992; Albermann *et al.*, 2005) and physiological barriers (Chan *et al.*, 2004; Loscher and Potschka, 2005). As regards the latter issue, it is well known that the active efflux of PIs, NRTIs and NNRTIs might produce subtherapeutic levels of drugs and favor the emergence of both resistant viral strains and sanctuary sites (Kim *et al.*, 1998; Schuetz *et al.*, 1999). Therefore, drug interaction studies and more particularly the interactions of FTC with efflux transporters and specifically MRPs might be taken into account in HIV patients undergoing an antiretroviral treatment combining this compound with other NRTIs, NtRTIs, NNRTIs and/or PIs. Some studies have shown that PIs are transported by MRP1 and MRP2 and that their intracellular concentrations depend on the activity of MRPs in CD4 cells (Huisman *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2001; Janneh *et al.*, 2005). Recently published observations of Weiss and colleagues using over-expressing cell lines MDCKII/MRP1, MDCKII/MRP2, MDCKII/MRP3 highlight the probable inhibition of MRPs by FTC (Weiss *et al.*, 2007). Inhibition of MRP-mediated efflux from the target cells could contribute to the superior effectiveness of combination therapy.

Understanding the regulation by FTC of both expression and function of these efflux proteins would be helpful in enhancing the penetration and accumulation of antiretroviral drugs within cells. We report here, for the first time, the dual action (inhibitor and substrate) of FTC on MRP1. Data on FTC treatment effects on the expression of MRP1 and Pgp in human lymphocytes are also presented. In addition, the influence of FTC inhibition of MRP1 on the intracellular accumulation of PIs is discussed.

METHODS

Subjects and 72-h treatment

Blood samples of healthy volunteer donors were obtained from the "Etablissement français du sang" (Rungis, France) or the "Hôpital d'Instruction des Armées Percy" (Clamart, France). PBMCs were isolated by density centrifugation in Histopaque-1077. Fresh cells were cultured in RPMI-1640 medium (Gibco, Cergy Pontoise, France) supplemented by 10% FBS, 2 mM glutamine, 50 µg/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin and 100 µg/ml neomycin (Gibco) at 37°C in a humid atmosphere with 5% CO₂. PBMCs were cultured at a density of 5x10⁶ cells/ml and transferred into separate wells with vehicle control (dimethyl sulfoxide 0.22%, Sigma Aldrich), 5 µM emtricitabine (FTC; Gilead Sciences, California, USA), 1 µM ritonavir (RTV)+ 5 µM lopinavir (LPV) (Abbott Laboratories, Illinois, USA), 1 µM RTV + 5 µM atazanavir (ATV; Bristol-Myers Squibb, New York, USA), 1 µM RTV + 5 µM LPV + 5 µM FTC or 1 µM RTV + 5 µM ATV + 5 µM FTC [ARV concentrations did not exceed solubility maxima (Storch *et al.*, 2007)]. Following a 72-h incubation at 37°C, the contents of each well (1 ml) were transferred into

separate 1.5 ml tubes and washed with cold PBS (Gibco).

Real-time RT-PCR and quantification of MDR1 and MRP1 mRNA copy number in PBMCs

First of all, quantification of transporter mRNA expressed in untreated PBMCs were determined, using a validated method of quantitative RT-PCR (Camus *et al.*, 2006). Total RNA were extracted from pellets (5 x 10⁶ cells) using GenElute™ mamalian total RNA kit (Sigma Aldrich). Total RNA concentration and purity were then determined by measuring absorbance at 260 nm and 280 nm. The A260/A280 ratio was comprised between 1.7 and 2. Reverse transcription (RT) was performed with 0.25 µg of total RNA using enhanced avian RT according to the manufacturer's instructions (Sigma Aldrich). For MDR1 gene (encoding for Pgp), a 25 µl reaction volume was prepared containing 1X AccuTaq buffer, 200 nM of each primer, 0.1 u/µl of AccuTaq LA DNA polymerase (Sigma Aldrich, St Quentin-Fallavier, France), 500 µM of dNTP Mix, Syber Green I 0.1X and 10 nM fluorescein. For MRP gene expression, RT-PCR was performed with Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Syber green 0.1X, 10 nM fluoroscein and 200 nM of each primer were added. Specific reverse and forward oligonucleotide primers and RT-PCR conditions are listed in Table 1. PCR was carried out in an iCycler System (Biorad, Marnes la Coquette, France). The specificity of the amplification was confirmed by the melting curves (-d(RFU)/dT vs T°C).

Since MRP2 and MRP3 were not detectable in our experimental system, quantification of MDR1 and MRP1 mRNA copy number was determined, as previously described (Camus *et al.*, 2006).

TABLE 1

Primer Sequences and Methods used for RT-PCR on PBMCs

PCR primer name	Sequence (5'-3')	RT-PCR conditions
MDR1 (forward primer)	CAGAGGGGATGGTCAGTGT	Initial denaturation cycle : 5 min at 95°C 38 amplification cycles : 15 s at 95°C, 1 min at 62°C , 1 min 72°C
MDR1 (reverse primer)	TCATAGGCATTGGCTTCCTT	
MRP1 (forward primer)	GCCGGTGAAGGTTGTGTACT	Initial denaturation cycle : 1 min 45 s at 95°C 38 amplification cycles : 15 s at 95°C, 30 s at 60°C, 1 min 72°C
MRP1 (reverse primer)	GCAACTTTAAGATCTGCGGC	
MRP2 (forward primer)	CTTGAGCCCAGGAGTTTGAG	
MRP2 (reverse primer)	AGGAAAGGTCAGCTGTGGAA	
MRP3 (forward primer)	CCTTTGCCAACTTTCTCTGC	
MRP3 (reverse primer)	AGGGCACTCAGCTGTCTCAT	

Effect of antiretroviral regimen on Pgp or MRP1 expression by flow cytometry

Following 72-h incubation with antiretroviral regimen, expression of Pgp and MRP1 on lymphocytes was determined by direct immunofluorescence.

For Pgp expression analysis, part of the cells were fixed in CellFIX (1:10, 1 ml, 4°C; Becton Dickinson,

Le-Pont-De-Claix, France), centrifuged (500 g, 5 min, 4°C), and resuspended in PBS. For MRP1 expression analysis, the other part was fixed and permeabilized in CytoFIX/CytoPERM (1 ml, 20 min, 4°C; Becton Dickinson), centrifuged and resuspended in PermWash (1:10, 1 ml, 4°C; Becton Dickinson).

100 µl of each suspension of cells (5×10^5 cells) were transferred into clean 5 ml tubes for incubation with different combinations of antibodies. Pgp expression was determined by incubation with 20 µl of UIC2:rPE antibody [specific for Pgp (Meaden *et al.*, 2002) (Beckman Coulter, Roissy, France)] and with the isotype control antibody IgG2a (20 µl) for 1 h at 4 °C in the dark. MRP1 expression was determined as mentioned above but with 10 µl of QCRL:rPE antibody [specific clone for MRP1 (Ferneti *et al.*, 2001) (R&D Systems, Lille, France)] and with the isotype control antibody IgG1 (10 µl) for 1 h at 4°C in the dark. Following antibody incubation, all samples were washed twice (1 ml PBS supplemented with 1% BSA, 4°C) followed by centrifugation (500 g, 5 min, 4°C) and analyzed by flow cytometry (N=9).

Transporter expression in the electronically gated lymphocyte population was detected from a histogram measuring the FL2 fluorescence, as described previously (Bousquet *et al.*, 2008). Since there is a direct relation between the level of transporter expression and the shift in fluorescence, transporter expression was shown as a mean increase in fluorescence (FL2). The mean increase in treated samples was then normalized with the mean increase in vehicle samples (DMSO 0.22%).

Effect of antiretroviral regimen on Pgp or MRP1 function by flow cytometry

Following 72-h incubation, Pgp and MRP1 functionality was assessed by measuring fluorescent dye efflux (calcein-AM), either with or without specific inhibitors (Legrand *et al.*, 1998). Cells (5×10^5 cells) were washed with cold PBS and incubated with 0.1 µM of calcein-AM for 30 min at 37°C in 1 ml RPMI medium with or without modulators [2 µM cyclosporin A (Sigma Aldrich), 30 µM verapamil (Sigma Aldrich) or 30 µM MK571 (Calbiochem, VWR, Fontenay-sous-Bois, France)]. Cells were washed twice in cold PBS, then fixed with CellFIX (1:10, 400 µl, 4°C) and analyzed in a flow cytometer.

Fluorescence due to calcein was followed in channel 1 (FL1) in an electronically gated lymphocyte population and plotted as a histogram of FL1 staining. Transporter function was quantified as previously described (Rautio *et al.*, 2006) by using the following equation:

$$\text{Percentage activity (\%)} = 100 - \frac{\text{Gmean}_{\text{calcein}}}{\text{Gmean}_{\text{inhibitor}}} \times 100$$

where $\text{Gmean}_{\text{calcein}}$ is the geometric median fluorescence of calcein in tested samples and $\text{Gmean}_{\text{inhibitor}}$ is the geometric median fluorescence of calcein in the presence of inhibitor (2 µM cyclosporin A, 30 µM verapamil or 30 µM MK571). Each experiment was performed on 11 different donors with verapamil, 7 different donors with cyclosporin A and 9 different donors with MK571.

FTC accumulation in PBMCs with or without Pgp and MRP inhibitors

PBMCs (10×10^6 cells/ml) from healthy donors (N=7) isolated as mentioned above were incubated with efflux protein inhibitors, 2 µM cyclosporin A

(Legrand *et al.*, 1998) or 50 µM MK571 (Janneh *et al.*, 2005), for 30 min at 37°C in 1 ml complete RPMI medium. 5 µM FTC was then added to the medium, which was incubated for an additional hour. Following this incubation, cells were washed with cold PBS and centrifuged (500 g, 5 min, 4°C). Cell pellets were frozen at -20°C until LC-MS/MS analysis.

Inhibitory activity of FTC on MRP1

PBMCs (5×10^5 or 5×10^6 cells/ml for calcein or vincristine accumulation, respectively) from healthy donors isolated as mentioned above were incubated with MRP inhibitor MK571 (3 or 30 µM) as a positive control, or with different concentrations of FTC [(0.01-100 µM), range of soluble and non-cytotoxic concentrations (Storch *et al.*, 2007)], for 30 min at 37°C in 1 ml complete RPMI medium.

Calcein accumulation assay

Drug accumulation was started by the addition of calcein-AM (0.1 µM per 5 ml tube). Following 30 min incubation, cells (N=5) were centrifuged (500 g, 5 min, 4°C), washed twice in cold PBS, then fixed with CellFIX (1:10, 400 µl, 4°C) and analyzed in a flow cytometer. Fluorescence due to calcein was followed in channel 1 (FL1) in an electronically gated lymphocyte population and plotted as a histogram of FL1 staining. Inhibition of MRP1-dependent calcein-AM transport was determined by measuring the percentage of calcein fluorescence increase.

[³H]-vincristine accumulation assay

Vincristine is a Pgp, MRP1 and MRP2 substrate (Ozben, 2006). Its accumulation is proportional to transport inhibition. Drug accumulation was started by the addition of [³H]-vincristine (GE Healthcare, Orsay, France) (3.7×10^3 Bq per well). At the end of the 1-h incubation period, cells (N=4) were immediately collected, centrifuged (500 g, 5 min, 4°C) and washed with ice-cold PBS. Cells were then lysed in 1% Triton X-100 for 10 min and processed in 4 ml Aqualuma Plus for liquid scintillation counting. Inhibition of MRP1-dependent [³H]-vincristine transport was determined by measuring the percentage increase in radioactivity.

Drug quantification by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry detection

Analyte preparation

Analytes were extracted from PBMCs (samples, quality controls and standards) as described previously (Pruvost *et al.*, 2001). A 40 µl fraction of the remaining solution was injected into the HPLC-MS/MS. The PBMCs of each sample were counted using a validated biochemical test as described previously (Benech *et al.*, 2004). Intracellular concentrations were calculated by assuming cell volumes of 0.4 pl for each PBMC.

Analytical methodology for FTC quantification

The assay of intracellular FTC (N=9) has been adapted from a plasma assay method of tenofovir,

lamivudine and abacavir (Pruvost *et al.* 2006, 7th International Workshop on clinical Pharmacology of HIV Therapy, Lisbon, Portugal). Briefly, the chromatographic separation was achieved on a Phenomenex Synergi Polar-RP 4 μ m 50 x 2 mm column (Phenomenex, Le Pecq, France) thermostated at 40°C with a mobile phase comprising 0.5% formic acid and a methanol gradient delivered at a flow rate of 0.3 ml/min from 2 to 80% in 4 min followed by a 4-min equilibration period at 2% methanol. The mass spectrometry detection was performed with a triple quadrupole tandem mass spectrometer Quantum Discovery with an ESI source (Thermo-Fisher Scientific) monitored using data acquisition and treatment software Excalibur version 1.3.

Analytical methodology for PI quantification

The method of simultaneous determination of RTV and LPV has been described elsewhere (Pelerin *et al.*, 2005), and was adapted for ATV (N=12). The chromatographic separation was achieved on an LC system 1100 (Agilent Technology, Les Ulis, France), thermostated at 40°C with a mobile phase containing 10 mM ammonium acetate + 0.1% acetic acid buffer and an acetonitrile gradient delivered at a flow rate of 1 ml/min. The analytical column was a Nova Pack C18 60Å, 4 μ m particle size, 150 mm x 3.9 mm (Waters) with a (C18) guard column, Modulocart cartridge 10 mm x 2 mm (Interchim, Montluçon, France). A mass spectrometer was used for detection (triple quadrupole tandem mass spectrometer, API 3000 with an ESI source from Applied Biosystems, USA) monitored using data acquisition and treatment software Analyst version 1.4.2.

Statistics

Data are expressed as the mean \pm SEM. GraphPad Prism® 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used to perform statistical analysis. The significance of differences between groups and controls was evaluated by using Student's t-test. A p-value < 0.05 was considered significant.

RESULTS

Expression of multidrug resistance transporter expression on PBMCs

Quantitative real time PCR showed that PBMCs express higher levels of both MDR1 (encoding for Pgp) and MRP1 mRNA copy number (fig. 1) whereas MRP2 and MRP3 were not detectable. mRNA level of MRP1 is 5-fold higher than MDR1 one ($p = 0.0265$). MDR1 mRNA was around 22,000 copy number / μ g of cDNA and MRP1 mRNA around 110,000 copy number / μ g of cDNA. Expression of both transporters (Pgp and MRP1) showed inter-individual variation. This inter-individual variation was also evidenced at the protein levels (fig. 2-B). Since MRP2 and MRP3 were not detectable in our experimental system, we talk about MRP1 expression instead of MRP family member.

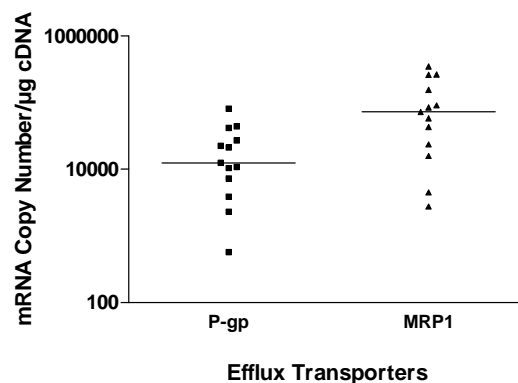


Figure 1: MDR1 and MRP1 mRNA levels on peripheral blood mononuclear cells from healthy volunteers (N=12)

They were determined by real-time RT-PCR. Data are expressed as a scatter plot and the median expression value is indicated by a horizontal line. Data are analyzed by the paired t test (* $p < 0.05$).

Effect of FTC on multidrug resistance transporter expression and function

Transporter expression

Following the 72-h incubation with FTC 5 μ M, the Pgp and MRP1 expression was investigated by direct immunofluorescence. In comparison with vehicle control (0.22% DMSO), cell treatment with FTC alone (5 μ M) did not show statistically significant change (N=9) in Pgp or MRP1 expression on total lymphocytes *in vitro* (fig. 2-B).

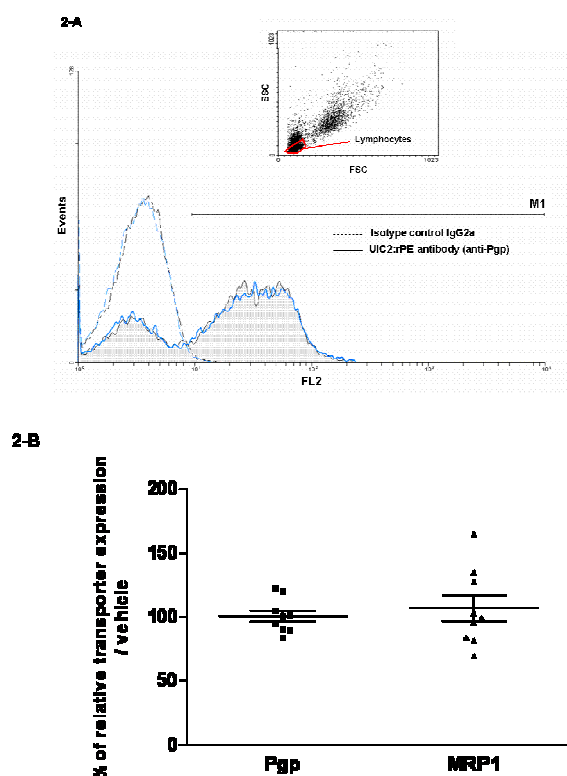


Figure 2: Pgp and MRP1 protein expression in lymphocytes

A- Histogram displaying the number of events detected in channel 2 (FL2) and fluorescence intensity from a subpopulation of total gated lymphocytes (in red on the dot blot graph, representing cell size SSC and granulometry FSC). IgG2a isotype control and Pgp labeled cells are in black for DMSO control and in blue for emtricitabine-treated cells. 68.5% (M1) of cells express Pgp in the control sample and 66.8% in the treated sample.

B- Effects of 5 μ M emtricitabine (FTC) treatment on Pgp or MRP1 expression [median increase of fluorescence compared with the drug vehicle control Dimethyl Sulfoxide (DMSO)] on total lymphocytes *in vitro*. Incubation time was 72 h, N=9. Data are expressed as a scatter plot and the median expression value is indicated by a horizontal line.

Transporter function

The percentage of MRP1 and Pgp activity was measured as described in the material and method section, by the effect of specific inhibitor on calcein-AM accumulation. Intracellular calcein concentration was greater in the presence than in the absence of inhibitor (verapamil, cyclosporin A or MK571). An example was represented in figure 3-A, showing higher calcein accumulation in the presence of MK571, and the effect of FTC on MRP transporter activity.

The percentage of inhibition caused by 30 μ M verapamil was $38 \pm 5\%$ in the DMSO control and $27 \pm 6\%$ in FTC-treated cells (N=11). The decrease in Pgp and MRP1 activity was statistically significant with $p=0.038$ (fig. 3-B). The percentage of inhibition caused by 30 μ M MK571 was $34 \pm 5\%$ in the DMSO control and $22 \pm 4\%$ in FTC-treated cells (N=9). The decrease in MRP1 activity was statistically

significant with $p=0.025$ (fig. 3-B). Cyclosporin A at the concentration of 2 μ M caused no statistically significant change in calcein-AM accumulation in FTC-treated cells (N= 7).

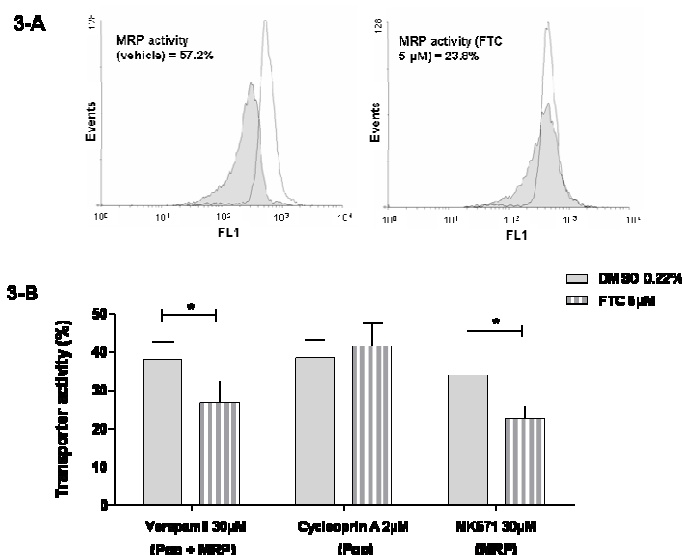


Figure 3: P-glycoprotein and MRP activity in lymphocytes

A- Example of MRP activity measurement: Histogram displaying the number of events detected in channel 1 (FL1) and fluorescence intensity from a subpopulation of total gated lymphocytes. The fluorescent dye accumulation (100 nM calcein-AM) was monitored alone (shaded) and in the presence of 30 μ M MK571 (unfilled).

B- Effects of 5 μ M emtricitabine (FTC) treatment on Pgp or MRP function (with 30 μ M verapamil, 2 μ M cyclosporin A or 30 μ M MK571) on total lymphocytes *in vitro*. Incubation time was 72 h. Data are expressed as means \pm SEM and analyzed by the paired t test [N=11 (verapamil), 7 (cyclosporin A) and 9 (MK571)], with $p<0.05$ as the limit of significance.

Effects of drug efflux inhibitors on FTC accumulation in PBMCs

The effect of different modulators on intracellular FTC accumulation was investigated in PBMCs. MK571 (50 μ M) significantly increased the cellular accumulation of 5 μ M FTC ($p=0.0005$) in PBMCs (10×10^6 cells) (fig. 4-A). In contrast, cyclosporin A (2 μ M) had no effect on the cellular accumulation of FTC (N=7) (fig. 4-B).

FTC concentration was 3.3 μ M in control cells, 2.8 μ M with cyclosporin A, and 5.5 μ M with MK571. We observed marked interindividual variability in the baseline cellular accumulation of FTC, but MK571 significantly increased accumulation in all 7 PBMC batches (65% median increase).

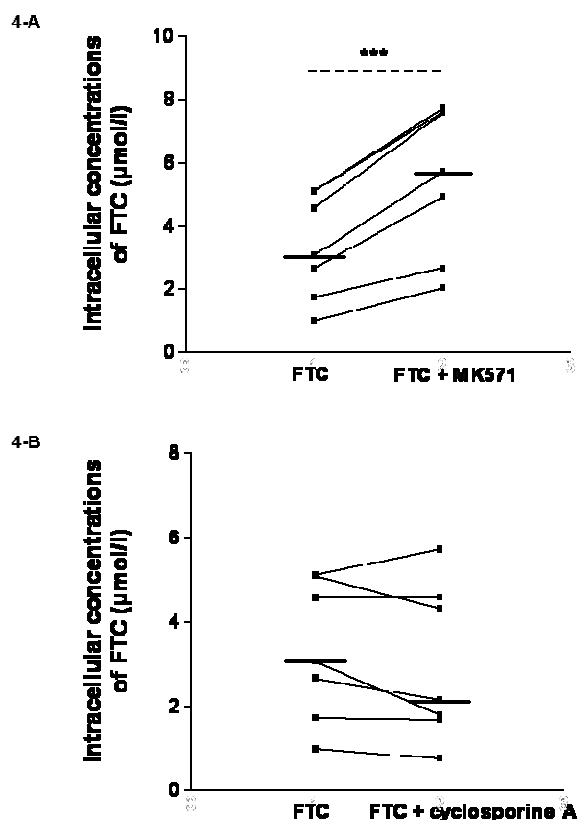


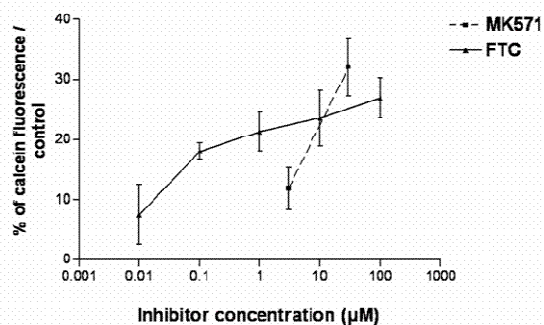
Figure 4: FTC intracellular accumulation in peripheral blood mononuclear cells

Cells (10×10^6 cells) were treated with FTC (5 μM) for 1 h at 37°C, with or without MK571 50 μM (A), or with or without cyclosporin A 2 μM (B). Individual data are shown (N=7), with each point representing a single experiment in a single healthy subject; median expression value is indicated by the bar. Data are analyzed by the paired t test, *** $p < 0.001$.

Inhibition of calcein-AM and [3 H]-vincristine transport

Inhibition of calcein-AM or [3 H]-vincristine extrusion was determined by measuring the percentage of calcein fluorescence or radioactivity increase, respectively. FTC increased intracellular calcein accumulation in a concentration-dependent manner to 26.3% with FTC 100 μM (N=5). With 30 μM MK571, calcein accumulation was 35.9% higher than in the control (fig. 5-A). These results were confirmed with another substrate, vincristine. With 30 μM MK571, [3 H]-vincristine accumulation was 67.0% higher than in the control (N=4). FTC increased intracellular [3 H]-vincristine accumulation in a concentration-dependent manner to 57.7% with FTC 100 μM, compared to the control (fig. 5-B). With both substrates, there is no difference in inhibitor potency of MK571 and FTC at the concentration of 10 μM.

5-A



5-B

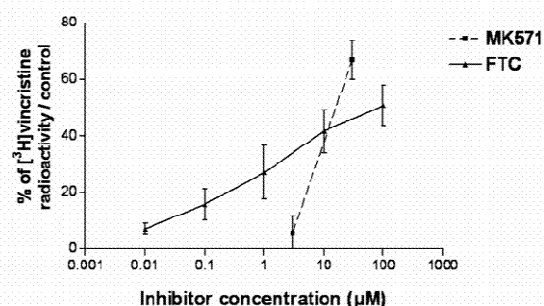


Figure 5: Inhibition of calcein and [3 H]-vincristine accumulations by emtricitabine (FTC)

A- Percentage fluorescence compared with the control (buffer without inhibitor)

B- Percentage of radioactivity compared with the control
Positive control: 3 μM and 30 μM MK571. Data are expressed as mean \pm SEM with N=4 (calcein) or 5 ([3 H]-vincristine).

Effect of FTC combination with PIs

To study the impact of MRP1 inhibition by FTC in a combination therapy, we investigated efflux transporter expression and function, following a 72h-treatment by FTC combined with PIs (RTV+LPV or RTV+ATV). Then, ARV concentrations were measured by LC-MS/MS.

Combination therapy effect on multidrug resistance transporter expression and function

In comparison with vehicle control (0.22% DMSO), cell treatment with FTC combined with PIs, either LPV+RTV or ATV+RTV, did not show statistically significant change (N=9) in Pgp or MRP1 expression on total lymphocytes.

Different inhibitors (verapamil, cyclosporin A and MK571) caused no significant change in calcein-AM accumulation in cells treated by FTC combined with PIs (RTV+LPV or RTV+ATV). The percentage of inhibition caused by 30 μM verapamil was $38 \pm 5\%$ in the DMSO control, $35 \pm 6\%$ in FTC+RTV+LPV treatment, $46 \pm 5\%$ in FTC+RTV+LPV treatment (N=11). The percentage of inhibition caused by 2 μM cyclosporin A was $38 \pm 5\%$ in the DMSO control, $42 \pm 5\%$ in FTC+RTV+LPV treatment, $40 \pm 5\%$ in FTC+RTV+LPV treatment (N=7). The percentage of inhibition caused by 30 μM MK571 was $34 \pm 5\%$ in

the DMSO control, $32 \pm 5\%$ in FTC+RTV+LPV treatment, $30 \pm 5\%$ in FTC+RTV+LPV treatment (N=9).

Intracellular accumulation of antiretroviral in PBMCs treated for 72h in vitro

Data, summarized in Table 2, showed no difference in FTC concentration when combined or not with PIs. FTC caused no statistically significant change

in RTV, LPV or ATV concentrations. ARV accumulated in PBMCs; intracellular / extracellular concentration ratios were around 4.3 for FTC, 11.54 for RTV, 15.57 for LPV and 6.25 for ATV. Intracellular LPV concentration was 2.5 times as high as ATV concentration and 3.8 times as high as FTC concentration, with the same extracellular concentration (5 μM).

TABLE 2

Intracellular antiretroviral (ARV) concentrations

ARV regimen (72h)	Emtricitabine (FTC) concentration ($\mu\text{mol/l}$)	Ritonavir (RTV) concentration ($\mu\text{mol/l}$)	Lopinavir (LPV) concentration ($\mu\text{mol/l}$)	Atazanavir (ATV) concentration ($\mu\text{mol/l}$)
FTC	22.25 ± 2.46			
RTV+LPV		10.61 ± 0.77	74.69 ± 4.37	
RTV+ATV		12.51 ± 0.85		32.66 ± 2.54
RTV+LPV+FTC	21.57 ± 1.27	11.07 ± 0.96	81.06 ± 5.85	
RTV+ATV+FTC	20.73 ± 1.61	11.94 ± 0.73		29.83 ± 2.88

Peripheral blood mononuclear cells were incubated with different antiretroviral regimens for 72 h and treated as described in Materials and Methods. Results are expressed as means \pm SEM (N=13 for PIs concentration and N=9 for FTC concentration). Intracellular concentrations were calculated by assuming cells volumes of 0.4 pl for each PBMC.

DISCUSSION

In this study, we showed that ABC transporters involved in drug efflux are expressed at detectable levels in PBMCs, major HIV target sites. We investigated whether emtricitabine (FTC) is a substrate and/or an inhibitor of MRP1. Moreover, we reported the impact of FTC combined with PIs (RTV, ATV, LPV) on Pgp and MRP1 expression and function in lymphocytes from healthy donors, and on their intracellular accumulation.

Using quantitative real time PCR, we have found that PBMCs express high levels of MRP1 and MDR1 (fig. 1), whereas no mRNA for MRP 2 and 3 have been evidenced in our experimental conditions. These facts have already been reported by Northern-blot and Western-blot analyses (Laupèze *et al.*, 2001). This is consistent with the spelling of MRP2 as canalicular multiorganic transporter present mainly in the canalicular membrane of hepatocytes (Paulusma *et al.*, 1997). MRP3 is mainly expressed in the liver, in the colon, in the intestine and in the adrenal gland and to a lower extent in several other tissues (Kool *et al.*, 1997). MRP1 is the major MRP family member expressed in PBMCs and widely accepted to cause clinical drug resistance.

Pgp and MRP1 expression and function levels have been found very variable between individuals as a result of genetic and cellular factors (fig. 1, 2-B and 3-B). Nevertheless, the inter-individual variation might be explained by the polymorphism of human genes which encode specifically for Pgp and MRP1 efflux transporters. For instance, polymorphisms in exon 26 of the human MDR1 gene which encodes Pgp have been shown to correlate with its

expression. This may account for some of the variability observed in Pgp (Cascorbi *et al.*, 2001; Hoffmeyer *et al.*, 2001). The GCC repeat length in the 5'UTR of MRP1 gene has recently been shown to be polymorphic. This polymorphic length of the GCC repeat might possibly be linked to additional sequences involved in regulation of constitutive or induced MRP1 expression (Nicolis *et al.*, 2006).

Differential regulation of Pgp expression has been reported, depending on target cells and ARV compound. For instance, 3 μM ATV did not cause a detectable increase in Pgp expression on LS180V cells (Perloff *et al.*, 2005). Ford and colleagues observed no difference in Pgp expression on lymphocytes following incubation with 10 μM RTV or LPV *in vitro* (Ford *et al.*, 2003). The induction of Pgp protein expression after short-term treatment with high concentrations of AZT was observed in lymphoblastoid cell lines (Signoretti *et al.*, 1997). AZT increased expression of the genes encoding Pgp, MRP4 and MRP5 in monocyte-derived macrophages (Jorajuria *et al.*, 2004). However, there are no data on Pgp and MRP1 regulation by FTC. Our results show no regulation of Pgp and MRP1 expression by FTC 5 μM (fig. 2-B).

Even if FTC has no effect on Pgp and MRP1 expression, this study suggests that FTC inhibits MRP1 function. Calcein-AM and vincristine are well-established Pgp and MRP1 index substrates (Weiss *et al.*, 2003; Ozben, 2006). Verapamil is used as Pgp and MRP inhibitor (Janneh *et al.*, 2006), cyclosporin A at the concentration of 2 μM as a specific Pgp inhibitor (Legrand *et al.*, 1998) and MK571 30 μM as a specific inhibitor of MRP associated drug-resistance (Gekeler *et al.*, 1995). Following the 72-h incubation with PBMCs, FTC 5

μM decreases calcein-AM efflux with both verapamil and MK571, but not with cyclosporin A (fig. 3-B). FTC 5 μM decreases MRP activity (*i.e.* MRP1, in our experimental system, see above). To determine if FTC is also a substrate of MRP1, we measured the intracellular accumulation of FTC in the presence of the two different efflux protein inhibitors, MK571 and cyclosporin A. MK571 50 μM , but not cyclosporin A 2 μM , increase FTC accumulation (fig. 4). Taken together, these results suggest an interaction of FTC with MRP1, in PBMCs.

Moreover, FTC increases calcein-AM and [^3H]-vincristine accumulation in a concentration-dependent manner, like MK571 (fig. 5). According to the previous results obtained in PBMCs, this increase might be due to MRP1 inhibition by FTC (until the concentration of 5 μM). However, it is possible that high concentrations of FTC inhibit other transporters. These findings are in agreement with those published by Weiss and colleagues on MDCKII cell lines overexpressing MRPs (Weiss *et al.*, 2007). In another study, only abacavir and tenofovir disoproxil fumarate weakly inhibited Pgp whereas all other NRTIs and tenofovir had no interaction with Pgp (Storch *et al.*, 2007).

MRP1 may contribute to drug-drug interactions *in vivo*. Given that PIs and more particularly RTV, LPV and ATV were associated with FTC, and that they could interact with MRP (Jones *et al.*, 2001; Van der Sandt *et al.*, 2001; Roucairol *et al.*, 2007), we evaluated combination effect on transporter expression and function, and each compound intracellular accumulation (table 2). We showed that FTC combined with PIs had no effect on transporter expression and function. Moreover, PI accumulation did not change in the presence of FTC and inversely. Indeed, antiretroviral accumulation depends on a dynamic balance between their physicochemical properties, transport by influx or efflux proteins, and their affinity for cellular proteins. PIs penetrate cells by passive diffusion and are sequestered in cytoplasm due to protein binding. Median intracellular accumulation ratios of FTC, RTV, LPV and ATV indicate that they accumulate within cells. These results are in agreement with those in previous studies measuring accumulation of SQV, RTV, ATV in PBMCs (Ford *et al.*, 2006), of SQV, RTV or indinavir (IDV) (Khoo *et al.*, 2002), and of ATV in CEM cells and PBMCs (Roucairol *et al.*, 2007). A hierarchy in intracellular accumulation of PIs has been previously observed, most probably related to the physicochemical characteristics of these drugs such as lipophilicity and plasma protein binding (Owen *et al.* Khoo, 2004).

The lack of FTC effect on PI accumulation might be explained by the fact that the system of efflux proteins in PBMCs may be insufficient or compensation between transporters may also occur. However, efflux transporters in physiological barriers play an important role in drug pharmacokinetic (absorption-distribution and elimination). If FTC decreased MRP1 on different physiological barriers, drug (FTC or other MRP substrates) accumulation could increase in plasma

and their accumulation in circulating cells like CD4+ cells could increase.

In conclusion, our results showed that emtricitabine has both inhibitor and substrate characteristics with MRP1 in PBMCs *in vitro*. Even if MRP2 and MRP3 were not evidenced in our system and experimental conditions, the interaction of FTC with the last transporters in other tissues could not be excluded. Peak plasma concentrations of emtricitabine are usually around 1.8 $\mu\text{g/ml}$ (7.2 μM) (Emtriva (emtricitabine) Product Information, Gilead Sciences, Inc., 2003) (Molina *et al.*, 2004). Considering these *in vivo* FTC concentrations, the *in vitro* data suggest a potential for FTC to cause drug interactions at the level of MRP-mediated drug transport.

However, this study suggests no drug-drug interactions between the NRTI emtricitabine and the protease inhibitors LPV/RTV and ATV/RTV. FTC accumulation in the case of a combination with tenofovir or NRTIs remains to be determined. This may highlight some reported observations in the use of FTC and tenofovir drugs as a dual NRTI backbone in combination therapy for the treatment of HIV-1 disease (Boroto-Esoda *et al.*, 2006). The clinical relevance of these effects on HIV patients undergoing antiretroviral treatment remains to be elucidated.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the "Agence Nationale de recherche sur le SIDA" for financial support.

REFERENCES

- Albermann N., Schmitz-Winnenthal F.H., Z'graggen K., Volk C., Hoffmann M.M., Haefeli E., Weiss J., 2005. Expression of the drug transporters MDR1/ABCB1, MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, BCRP/ABCG2, and PXR in peripheral blood mononuclear cells and their relationship with the expression in intestine and liver. *Biochem. Pharmacol.* 70(6), 949-58
- Benech H., Theodoro F., Herbet A., Page N., Schlemmer D., Pruvost A., Grassi J., and Deverre J.R., 2004. Peripheral blood mononuclear cell counting using a DNA-detection-based method. *Anal. Biochem.* 330, 172-174
- Boroto-Esoda K., Vela J.E., Myrick F., Ray A.S., Miller M.D., 2006. In vitro evaluation of the anti-HIV activity and metabolic interactions of tenofovir and emtricitabine. *Antivir. Ther.* 11(3), 377-84
- Bousquet L., Roucairol C., Hembury A., Nevers M.C., Créminon C., Farinotti R., Mabondzo A., 2008. Comparison of ABC transporter modulation by atazanavir in lymphocytes and human brain endothelial cells: ABC transporters are involved in the atazanavir-limited passage across an in vitro human model of the blood-brain barrier. *AIDS Res Hum Retroviruses.* In press.
- Cascorbi I., Gerloff T., Johne A., Meisel C., Hoffmeyer S., Schwab M., Schaeffeler E., Eichelbaum M., Brinkmann U., Roots I., 2001. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.* 69(3), 169-74

- Camus M., Deloménie C., Didier N., Faye A., Gil S., Dauge M.C., Mabondzo A., Farinotti R., 2006. Increased expression of MDR1 mRNAs and P-glycoprotein in placentas from HIV-1 infected women. *Placenta*. 27(6-7), 699-706
- Cascorbi I., Gerloff T., Johné A., Meisel C., Hoffmeyer S., Schwab M., Schaeffeler E., Eichelbaum M., Brinkmann U., Roots I., 2001. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.* 69(3), 169-74.
- Chan L.M., Lowes S., Hirst B.H., 2004. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur. J. Pharm. Sci.* 21(1), 25-51
- Chaudhary P.M., Mechetner E.B., Roninson I.B., 1992. Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. *Blood*. 80(11), 2735-9.
- Chearskul P., Rongkavilit C., Al-Tatari H., Asmar B., 2006. New antiretroviral drugs in clinical use. *Indian J. Pediatr.* 73(4), 335-41
- De Maat M.M., Ekhart G.C., Huitema A.D., Koks C.H., Mulder J.W., Beijnen J.H., 2003. Drug interactions between antiretroviral drugs and comedicated agents. *Clin. Pharmacokinet.* 42(3), 223-82
- Fernetti C., Pascolo L., Podda E., Gennaro R., Stebel M., Tiribelli C., 2001. Preparation of an antibody recognizing both human and rodent MRP1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288(4), 1064-8.
- Ford J., Boffito M., Maitland D., Hill A., Back D., Khoo S., Nelson M., Moyle G., Gazzard B., Pozniak A., 2006. Influence of atazanavir 200 mg on the intracellular and plasma pharmacokinetics of saquinavir and ritonavir 1600/100 mg administered once daily in HIV-infected patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 58(5), 1009-16
- Ford J., Meaden E.R., Hoggard P.G., Dalton M., Newton P., Williams I., Khoo S.H., Back D.J., 2003. Effect of protease inhibitor-containing regimens on lymphocyte multidrug resistance transporter expression. *J. Antimicrob. Chemother.* 52(3), 354-8. Epub 2003 Aug 13.
- Gekeler V., Ise W., Sanders K.H., Ulrich W.R., Beck J., 1995. The leukotriene LTD4 receptor antagonist MK571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208(1), 345-52.
- Hoffmeyer S., Burk O., von Richter O., Arnold H.P., Brockmoller J., Johné A., Cascorbi I., Gerloff T., Roots I., Eichelbaum M., Brinkmann U., 2000. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97(7), 3473-8
- Huisman M.T., Smit J.W., Crommentuyn K.M., Zelcer N., Wiltshire H.R., Beijnen J.H., Schinkel A.H., 2002. Multidrug resistance protein 2 (MRP2) transports HIV protease inhibitors, and transport can be enhanced by other drugs. *AIDS*. 16(17), 2295-301
- Janneh O., Owen A., Chandler B., Hartkoorn R.C., Hart C.A., Bray P.G., Ward S.A., Back D.J., Khoo S.H., 2005. Modulation of the intracellular accumulation of saquinavir in peripheral blood mononuclear cells by inhibitors of MRP1, MRP2, P-gp and BCRP. *AIDS*. 19(18), 2097-102.
- Jones K., Bray P.G., Khoo S.H., Davey R.A., Meaden E.R., Ward S.A., Back D.J., 2001. P-Glycoprotein and transporter MRP1 reduce HIV protease inhibitor uptake in CD4 cells: potential for accelerated viral drug resistance? *AIDS*. 15(11), 1353-8
- Jorajuria S., Dereuddre-Bosquet N., Becher F., Martin S., Porcheray F., Garrigues A., Mabondzo A., Benech H., Grassi J., Orlowski S., Dormont D., Clayette P., 2004. ATP binding cassette multidrug transporters limit the anti-HIV activity of zidovudine and indinavir in infected human macrophages. *Antivir Ther.* 9(4):519-28
- Khoo S.H., Hoggard P.G., Williams I., Meaden E.R., Newton P., Wilkins E.G., Smith A., Tjia J.F., Lloyd J., Jones K., Beeching N., Carey P., Peters B., Back D.J., 2002. Intracellular accumulation of human immunodeficiency virus protease inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46(10), 3228-35
- Kim R.B., Fromm M.F., Wandel C., Leake B., Wood A.J., Roden D.M., Wilkinson G.R., 1998. The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors. *J. Clin. Invest.* 101(2), 289-94
- Kool M., de Haas M., Scheffer G.L., Scheper R.J., van Eijk M.J., Juijn J.A., Baas F., Borst P., 1997. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 57(16), 3537-47
- Laupéze B., Amiot L., Payen L., Drenou B., Grosset J.M., Lehne G., Fauchet R., Fardel O., 2001. Multidrug resistance protein (MRP) activity in normal mature leukocytes and CD34-positive hematopoietic cells from peripheral blood. *Life Sci.* 68(11), 1323-31
- Legrand O., Simonin G., Perrot J.Y., Zittoun R., Marie J.P., 1998. Pgp and MRP activities using calcein-AM are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia patients. *Blood*. 91(12), 4480-8.
- Löscher W., Potschka H., 2005. Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx*. 2(1), 86-98
- Meaden E.R., Hoggard P.G., Khoo S.H., Back D.J., 2002. Determination of P-gp and MRP1 expression and function in peripheral blood mononuclear cells in vivo. *J. Immunol. Methods*. 262(1-2), 159-65.
- Molina J.M. and Cox S.L., 2005. Emtricitabine: a novel nucleoside reverse transcriptase inhibitor. *Drugs Today (Barc)*. 41(4), 241-52
- Molina J.M., Peytavin G., Perusat S., Lascoux-Combes C., Sereni D., Rozenbaum W., Chene G., 2004. Pharmacokinetics of emtricitabine, didanosine and efavirenz administered once-daily for the treatment of HIV-infected adults (pharmacokinetic substudy of the ANRS 091 trial). *HIV Med.* 5(2):99-104.
- Nicolis E., Pasetto M., Cigana C., Pradal U., Assael B.M., Melotti P., 2006. The GCC repeat length in the 5'UTR of MRP1 gene is polymorphic: a functional characterization of its relevance for cystic fibrosis. *BMC Med. Genet.* 7, 7
- Owen A. and Khoo S.H., 2004. Intracellular pharmacokinetics of antiretroviral agents. *J. HIV Ther.* 9(4), 97-101

Ozben T., 2006. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS Lett.* 580(12), 2903-9

Paulusma C.C., Kool M., Bosma P.J., Scheffer G.L., ter Borg F., Scheper R.J., Tytgat G.N., Borst P., Baas F., Oude Elferink R.P., 1997. A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology.* 25(6), 1539-42

Pélerin H., Compain S., Duval X., Gimenez F., Benech H., Mabondzo A., 2005. Development of an assay method for the detection and quantification of protease and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in plasma and in peripheral blood mononuclear cells by liquid chromatography coupled with ultraviolet or tandem mass spectrometry detection. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 819(1), 47-57

Perloff E.S., Duan S.X., Skolnik P.R., Greenblatt D.J., von Moltke L.L., 2005. Atazanavir: effects on P-glycoprotein transport and CYP3A metabolism in vitro. *Drug Metab. Dispos.* 33(6), 764-70

Pruvost A., Becher F., Bardouille P., Guerrero C., Creminon C., Delfraissy J.F., Goujard C., Grassi J., Benech H., 2001. Direct determination of phosphorylated intracellular anabolites of stavudine (d4T) by liquid chromatography / tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15(16), 1401-8.

Rautio J., Humphreys J.E., Webster L.O., Balakrishnan A., Keogh J.P., Kunta J.R., Serabjit-Singh C.J., Polli J.W., 2006. In vitro p-glycoprotein inhibition assays for assessment of clinical drug interaction potential of new drug candidates: a recommendation for probe substrates. *Drug Metab. Dispos.* 34(5), 786-92

Roucairol C., Azoulay S., Nevers M.C., Creminon C., Lavrut T., Garraffo R., Grassi J., Burger A., Duval D., 2007. Quantitative immunoassay to measure plasma and intracellular atazanavir levels: analysis of drug accumulation in cultured T cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51(2), 405-11

Schuetz J.D., Connelly M.C., Sun D., Paibir S.G., Flynn P.M., Srinivas R.V., Kumar A., Fridland A., 1999. MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. *Nat. Med.* 5(9), 1048-51

Signoretti C., Romagnoli G., Turriziani O., Antonelli G., Dianzani F., Cianfriglia M., 1997. Induction of the multidrug-transporter P-glycoprotein by 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) treatment in tumor cell lines. *J Exp Clin Cancer Res.* 16(1):29-32

Storch C.H., Theile D., Lindenmaier H., Haefeli W.E., Weiss J., 2007. Comparison of the inhibitory activity of anti-HIV drugs on P-glycoprotein. *Biochem. Pharmacol.* 73(10):1573-81

Van der Sandt I.C., Vos C.M., Nabulsi L., Blom-Roosemalen M.C., Voorwinden H.H., de Boer A.G., Breimer D.D., 2001. Assessment of active transport of HIV protease inhibitors in various cell lines and the in vitro blood--brain barrier. *AIDS.* 15(4):483-91

Weiss J., Dormann SM, Martin-Facklam M, Kerpen CJ, Ketabi-Kiyanvash N, Haefeli WE (2003) Inhibition of P-glycoprotein by newer antidepressants. *J Pharmacol Exp Ther* 305(1):197-204

Weiss J., Theile D., Ketabi-Kiyanvash N., Lindenmaier H., Haefeli W.E., 2007. Inhibition of MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, and MRP3/ABCC3 by nucleoside, nucleotide, and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Drug Metab. Dispos.* 35(3), 340-4

2- Résultats complémentaires sur l'expression des ARNm de la Pgp et de la MRP1

Cette expérience de RT-PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne en Temps réel) est qualitative. Il s'agit d'une comparaison de l'expression des ARN messagers de la Pgp et de la MRP1 par rapport à celle d'un gène de référence, la GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase). La différence d'expression est évaluée par comparaison du nombre de cycles de RT-PCR (C_T). Plus un gène est exprimé, plus son nombre de cycle de PCR est faible.

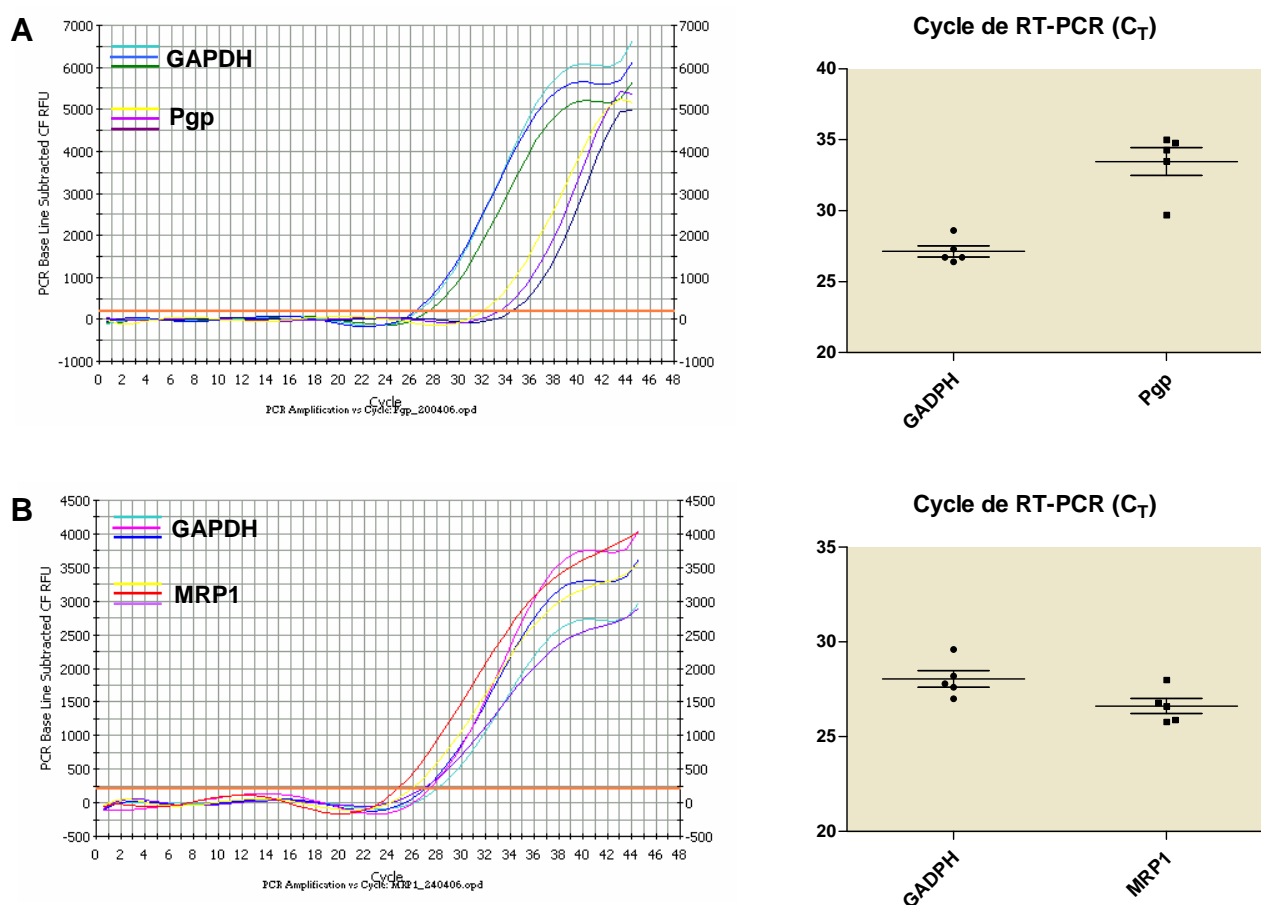


Figure 43 : Etude de l'expression de la Pgp et de la MRP1 dans les CMSPs non traités par RT-PCR en temps réel

A- Courbe d'intensité de fluorescence en fonction des cycles de PCR (C_T) pour les PCR avec les amorces Pgp et GAPDH

Moyenne des C_T (N=5) pour la Pgp et la GAPDH

B- Courbe d'intensité de fluorescence en fonction des cycles de PCR (C_t) pour les PCR avec les amorces MRP1 et GAPDH

Moyenne des C_T (N=5) pour la Pgp et la GAPDH

Ces résultats ne sont en rien quantitatifs et nous permettent juste de déduire que la Pgp est moins exprimée dans les CMSPs de patients sains que la GAPDH, et que la MRP1 est un peu plus exprimée que ce même gène de référence. La Pgp semble donc beaucoup moins exprimée que la MRP1.

Ceci avait déjà été montré par Nathalie Didier au sein du laboratoire, par RT-PCR quantitative. Elle avait montré que la MRP1 est 5 fois plus exprimée dans les CMSPs que la Pgp. Dans cette même expérience, les ARNm des MRPs 2 et 3 n'étaient pas détectables.

3- Discussion

Les résultats obtenus au cours de ce travail sont de plusieurs ordres. Tout d'abord, nous avons montré que les transporteurs ABC impliqués dans l'efflux d'antirétroviraux sont exprimés à des niveaux détectables par RT-PCR dans les cellules mononucléées non activées du sang périphérique, principales cibles du VIH-1. Cette étude a permis de savoir si le FTC était substrat et/ou inhibiteur de ces transporteurs. De plus, nous avons rapporté l'effet du FTC, associé ou non avec des IPs (RTV, ATV, LPV), sur l'expression et la fonctionnalité de la Pgp et des MRPs dans les lymphocytes de donneurs sains, ainsi que les conséquences sur leur concentration intracellulaire.

Des expériences préliminaires de RT-PCR en temps réel, effectuées par Nathalie Didier, ont montré que les CMSPs exprimaient de hauts niveaux d'ARNm des gènes *mrp1* (codant pour la MRP1) et *mdr1* (codant pour la Pgp), alors que les ARNm des gènes *mrp2* et *mrp3* (codant pour les MRPs 2 et 3) n'ont pas pu être détectés dans notre système expérimental. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Northern-Blot et Western-Blot (Laupèze *et al.*, 2001). En effet, la MRP2, également appelé transporteur multi-organique canaliculaire, est majoritairement présente dans la membrane canaliculaire des hépatocytes (Paulusma *et al.*, 1997). La MRP3, quant à elle, est principalement exprimée dans le foie, le colon, l'intestin, la glande surrénale et à un bien moindre niveau dans d'autres tissus (Kool *et al.*, 1997).

D'autres expériences réalisées par la suite, ont pu mettre en évidence que la MRP5 et dans une moindre mesure la MRP6 étaient également exprimées dans les CMSPs (voir le chapitre 2 *Résultats*). Le FTC étant un analogue nucléosidique, il pourrait également interagir avec la MRP5, transporteur de nucléosides et nucléotides endogènes (Ritter *et al.*, 2005 ; Wijnholds *et al.*, 2000), même si ce transporteur, semblable à la MRP4, pourrait d'avantage être impliqué dans le transport de métabolites mono-phosphorylés comme la d4T-MP (Wijnholds *et al.*, 2000), l'AZT-MP, le PMEA (Schuetz *et al.*, 1999) ou le TFV (Ray *et al.*, 2006).

Nos résultats ne montrent aucune régulation de l'expression de la Pgp et de la MRP1 par le FTC seul ou associé aux IPs. Ils sont cohérents avec les données de la littérature. Dans des cellules LS180V, 3 μ M d'ATV ne semblaient pas provoquer de différence d'expression de la Pgp (Perloff *et al.*, 2005). Ford *et al.* n'ont pas observé de différence d'expression de la Pgp dans les lymphocytes traités avec 10 μ M de RTV ou de LPV (Ford *et al.*, 2003). Cependant, aucune donnée n'est disponible quant à la régulation de l'expression protéique de la Pgp et de la MRP1 par le FTC.

Même si le FTC n'a aucun effet sur l'expression de la Pgp et de la MRP1 dans les lymphocytes, cette étude suggère qu'il inhibe la fonctionnalité des MRPs. Après 72 h d'incubation, le FTC 5 μ M diminue l'efflux de la calcéine avec le verapamil et le MK571, mais pas avec la cyclosporine A.

Pour déterminer si le FTC est aussi substrat des MRPs, nous avons mesuré l'accumulation intracellulaire du FTC en présence des deux inhibiteurs utilisés précédemment (MK571 et cyclosporine A). Le MK571 50 μ M, et non la cyclosporine A 2 μ M, augmente la concentration du FTC dans les CMSPs. L'ensemble de ces résultats suggèrent une interaction du FTC avec les MRPs dans les CMSPs. Malheureusement, il n'existe pas, à ce jour, d'inhibiteur spécifique d'un seul membre de la famille des MRPs. Il n'est donc pas possible de discriminer celui impliqué dans le transport du FTC dans les CMSPs.

De plus, le FTC augmente l'accumulation de calcéine-AM et de [3 H]-vincristine d'une manière concentration dépendante, tout comme le MK571. En tenant compte des résultats précédents, cette augmentation pourrait être due à l'inhibition des MRPs par le FTC (jusqu'à la concentration de 5 μ M). Cependant, il est possible que de plus fortes concentrations de FTC inhibent d'autres transporteurs. Ces résultats sont en adéquation avec ceux obtenus dans des lignées cellulaires surexprimant les MRPs (Weiss *et al.*, 2007-b).

Le FTC pourrait donc contribuer à des interactions médicamenteuses *in vivo*. Puisque les IPs, et plus particulièrement le RTV, le LPV et l'ATV, sont souvent co-administrés avec du FTC, nous avons décidé d'étudier l'impact de l'inhibition des MRPs, sur les concentrations intracellulaires de ces IPs associés au FTC.

Même si le FTC diminue l'activité des MRPs, il ne change en rien l'accumulation des IPs dans la cellule. Le système des protéines d'efflux pourrait être insuffisant dans les CMSPs. En effet, les IPs rentrent dans la cellule de manière passive et s'accumulent grâce à des liaisons aux protéines cytoplasmiques. Ils pourraient donc saturer les transporteurs d'efflux présents à la surface des lymphocytes. Il est également possible qu'il existe des systèmes de compensation entre les protéines d'efflux, les IPs étant substrats de plusieurs transporteurs.

L'accumulation des ARV dans une cellule dépend de l'équilibre entre leurs propriétés physiologiques, leur transport par des protéines d'efflux, et leur affinité pour les protéines cytoplasmiques. Les ratios concentration intracellulaire/concentration extracellulaire pour le FTC, l'ATV, le LPV, le RTV indiquent qu'ils s'accumulent fortement dans la cellule. Ces résultats sont cohérents avec ceux de la littérature, mesurant l'accumulation du saquinavir (SQV), du RTV, de l'ATV dans les CMSPs (Ford *et al.*, 2006), du SQV, du RTV, de l'indinavir (IDV) (Khoo *et al.*, 2002), et de l'ATV dans les cellules épithéliales mammaires (CEM) et les CMSPs (Roucairol *et al.*, 2007). Une hiérarchie dans l'accumulation des IPs est observé (LPV>RTV>ATV), probablement liée à leur caractéristiques

physico-chimiques, telles que leur lipophilie ou leur liaison aux protéines plasmatiques et cytoplasmiques (Owen et Khoo, 2004).

En résumé, nos résultats montrent que le FTC a deux caractéristiques, à la fois substrat et inhibiteur des MRPs dans les CMSPs *in vitro*. Bien que la MRP1 et la MRP5 soient les membres les plus exprimés de cette famille de transporteur, et que la MRP2 et la MRP3 n'aient pas été mis en évidence dans nos conditions expérimentales, il n'est pas exclu que le FTC puisse interagir avec d'autres MRPs dans d'autres tissus.

L'association avec le FTC n'ayant aucune conséquence sur les concentrations intracellulaires des IPs, cette étude suggère également qu'il n'y a pas d'interaction médicamenteuse entre le FTC et les IPs (LPV/rtv et ATV/rtv).

.

Chapitre 2

Association Tenofovir – Emtricitabine – Efavirenz

Régulation *in vitro* des MRPs

Conséquences sur leur concentration intracellulaire

Ce travail a fait l'objet d'un article soumis dans *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (juin 2008) et ayant pour titre :

Combination of Tenofovir and Emtricitabine plus Efavirenz: *In Vitro* Modulation of MRP transporter and Intracellular Drug Accumulation

Il a également été présenté aux congrès suivants :

15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, 3-6 février 2008, Poster n°755

9th International Workshop on Clinical Pharmacology of HIV Therapy, New Orleans, 7-9 avril 2008, Poster n°21

1- Introduction

Dans le premier chapitre de Résultats, nous avons étudié l'association de l'emtricitabine avec les inhibiteurs de la protéase (ritonavir, lopinavir, atazanavir), montrant qu'il n'y avait pas d'interaction médicamenteuse entre ces différentes molécules. Nous avons également montré que cet INTI, le FTC, pouvait être à la fois substrat et inhibiteur des MRPs. Nous avons donc choisi de poursuivre nos recherches sur une autre combinaison thérapeutique avec le FTC, utilisée par les cliniciens. Nous nous sommes intéressés à l'ATRIPLA (Bristol-Myers Squibb et Gilead Sciences) qui contient un INNTI, l'efavirenz (EFV), un INTI, le FTC, et un INtTI, le ténofovir (TFV).

ATRIPLA est le premier régime posologique basé sur un seul comprimé à prendre une fois par jour (Killingley et Pozniak, 2007). Il nous a semblé intéressant d'étudier cette combinaison qui montre déjà une bonne efficacité *in vivo*. En effet, des études sur des patients traités avec FTC, TDF et EFV montrent une meilleure pérennité de la suppression de la charge virale et un meilleur maintien du taux

de lymphocytes CD4, que des patients traités avec Zidovudine / lamivudine et EFV (Arribas *et al.*, 2008 ; Pozniak *et al.*, 2006).

Cette étude nous a permis d'évaluer l'impact d'une multi-thérapie associant FTC, TFV, EFV, sur leurs concentrations intracellulaires. Elle nous a également permis de définir son impact sur l'expression et la fonctionnalité des transporteurs ABC.

Les résultats expérimentaux montrent que les cellules traitées en double (FTC+TFV ou TFV+EFV) ou en triple association (FTC+TFV+EFV) ont des concentrations intracellulaires plus élevées de FTC et de TFV que les cellules traitées avec le FTC ou le TFV seuls. En revanche, aucun changement dans la concentration d'EFV n'est observé.

Le FTC induit l'expression du gène *mrp5*, l'EFV induit l'expression des gènes *mrp1* et *mrp6*, tandis que le TFV tend à réduire l'expression des gènes *mdr1*, *mrp1*, *mrp5* et *mrp6*. Dans ces conditions expérimentales, une diminution de la fonctionnalité des MRPs par ces médicaments (seuls ou associés) est observée et est associée à une inhibition directe de ces transporteurs.

ARTICLE 2

Combination of Tenofovir and Emtricitabine plus Efavirenz: *In Vitro* Modulation of MRP transporter and Intracellular Drug Accumulation

Antimicrobial Agents and Chemotherapy

Antimicrobial Agents and Chemotherapy

Combination of Tenofovir and Emtricitabine plus Efavirenz: In Vitro Modulation of MRP transporter and Intracellular Drug Accumulation

Laurence Bousquet^{1, 2}, Alain Pruvost¹, Anne Cécile Guyot¹, Robert Farinotti^{2, 3}, Aloïse Mabondzo^{1*}

1- CEA, iBiTecS, Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse, Gif sur Yvette, F-91191, France ; 2- Pharmacie Clinique, EA 2706 Barrières et Passage des Médicaments, Université Paris Sud, Faculté de Pharmacie, 92296 Châtenay-Malabry, France ; 3- Pharmacie, hôpital Pitié-Salpêtrière, Assistance publique des hôpitaux de Paris, Paris, France

Efflux proteins have been shown to greatly affect uptake by cells of antiretroviral drugs and to hamper their access to the HIV-1 replication site. This study evaluated the factors that may lead to drug-drug interactions between emtricitabine (FTC), tenofovir (TFV) and efavirenz (EFV), including modulation of efflux transporter expression and function.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy volunteers were used to determine whether or not the interaction between antiretroviral drugs and target cells occurred in any combinations of FTC, TFV, EFV, FTC+TFV, TFV+EFV or FTC+TFV+EFV. Following 20-h treatment with those combinations, intracellular drug concentrations were measured by LC-MS/MS. Efflux transporter functionality or inhibitor drug properties were assessed by measuring fluorescent dye efflux. Pgp (P-glycoprotein), MRP (multidrug resistance-associated protein) and OAT (organic anion transporter) expression in response to

treatments was quantified by semi-quantitative real-time PCR (RT-PCR).

Cells treated in dual (FTC+TFV or TFV+EFV) or triple combination (FTC+TFV+EFV) produced higher FTC and TFV intracellular concentrations compared with cells treated with FTC or TFV alone. However, no change in EFV intracellular concentration was observed. FTC induced mrp5 mRNA expression; EFV induced mrp1 and mrp6 mRNA expression, whereas TFV tended to reduce mdr1, mrp1, mrp5 and mrp6 mRNA expression. In these experimental conditions, a decrease in MRP functionality was observed and associated with direct inhibitory action of these drugs.

This in vitro study reveals a benefit for the combination therapy ATRIPLA (FTC+TFV+EFV), in term of intracellular FTC and TFV concentrations, and highlights the pharmacological mechanisms leading to this effect.

The combined administration of at least 3 anti-HIV drugs from different drug classes as highly active antiretroviral therapy (HAART) has been shown to slow the progression of disease, improve survival, and result in better virologic and immunologic responses (10). The USA Panel of the International AIDS Society recommends combination therapies that comprise a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) or a protease inhibitor (PI) boosted with low-dose ritonavir, each combined with two nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors (NRTI / NtRTI), for the treatment of adult HIV infection (18). ATRIPLA (Bristol-Myers Squibb and Gilead Sciences) which contains the NNRTI efavirenz, the NRTI emtricitabine, and the NtRTI tenofovir disoproxil fumarate (TDF, an oral prodrug of tenofovir), is the first once-daily single-tablet regimen (29).

Viral resistance, lack of adherence and pharmacological factors may contribute to HIV treatment failure. Efforts to predict treatment failure currently focus on measurement of plasma antiretroviral drug concentrations (38). However, this is not the only relevant biological variable. Drug

efflux transport systems, such as P-glycoprotein (Pgp) and multidrug resistance-associated proteins (MRPs), resulting in low intracellular levels of parental antiretroviral drugs or active derivatives, are of particular importance (26). The efficacy of a combination therapy depends on the activation level of targeted cells and on drug interactions which may limit drug access to the target sites of HIV replication.

MRPs and Pgp belong to the ATP-binding cassette (ABC) superfamily of membrane transporter proteins (20,30). They are present in lymphocytes and monocytes (1,32) and on physiological barriers [e.g. blood brain barrier (36)], where they are involved in the active efflux of a wide variety of drugs (17). Transport substrates of Pgp are mostly hydrophobic. MRP substrates are represented by amphiphilic anions like conjugates of lipophilic compounds with glutathione, glucuronate, or sulfate (31).

Interactions of protease inhibitors with Pgp and MRPs have been extensively studied, showing that they are either substrates or modulators of efflux

transporters (9,15,23,33,42,48,54). However, data concerning interaction of NNRTIs or NRTIs with efflux transporters are sparse and conflicting.

Some studies report that NNRTIs are neither Pgp substrates (13,50) nor Pgp modulators (7). Others indicate the potential of long-term treatment with efavirenz (EFV) to induce Pgp expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (9) or in the LS180 cell line (57). EFV, but not tenofovir (TFV) and emtricitabine (FTC), seems to inhibit Pgp in MDCKII-*mdr1* cells (46,49). A recent publication on the LS180 cell line, shows that long term incubation with high concentrations of FTC, but not TFV, can increase *mdr1* mRNA expression and Pgp function (57).

Interaction of these drugs with MRPs has been reported. The role of MRP4 in the renal elimination of TFV has been demonstrated in MRP4 knockout mice (24). In MRP2- and MRP4-overexpressing MDCKII cells, Ray *et al.* (46) showed that MRP4, but not MRP2, transport TFV. They also reported that TFV does not interact with MRP2-mediated calcein accumulation. However, in the same cell line, Weiss *et al.* (56) demonstrated that TFV, EFV and FTC interact with MRP1, MRP2 and MRP3.

Interaction of TFV with human OATs, hOAT1 and hOAT3, two members of the SLC family, has also been reported in the HEK293 transfected cell line (52).

In vivo, combinations of tenofovir and lamivudine or emtricitabine appear to provide improved virologic responses (3). A regimen of TDF/FTC and EFV demonstrates superior durability of viral load suppression and an improved safety and morphologic profile compared with zidovudine/lamivudine and EFV (2,43). Drug combinations are aimed at synergism between the compounds, while reducing the likelihood of development of drug resistance.

The present study assessed whether and how the dual or triple combination of FTC, TFV and EFV may lead to higher intracellular drug concentrations. Particular emphasis was given to modulation of transporter expression and function, or direct transporter inhibition by antiretroviral agents.

METHODS

Subjects and cell treatment

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors ("Etablissement français du sang", Rungis, France) were isolated and treated with vehicle control (DMSO 0.2%, Sigma Aldrich, St Quentin-Fallavier, France), emtricitabine (a generous gift of Gilead Sciences, California, USA), tenofovir (a generous gift of Gilead Sciences, California, USA), efavirenz (a generous gift of Bristol-Myers Squibb, New York, USA), alone or combined (5 µM each) in RPMI-1640 medium (Gibco, Cergy Pontoise, France) supplemented by 10% fetal bovine serum, 2 mmol/L glutamine, 50 µg/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin and 100 µg/mL neomycin (Gibco) for 20 h at 37°C in a humid atmosphere with 5% CO₂.

Quantitation of FTC, TFV and EFV in PBMC by LC-MS/MS

Analytes were extracted from PBMCs, samples, quality controls and standards, as has been reported (44). A 40 µl fraction of the remaining solution was injected into the HPLC-MS/MS as previously described (35) and adapted for FTC and EFV detection. Briefly, the chromatographic separation was achieved on a Phenomenex Synergi Polar-RP 4 µm 50 x 2 mm column (Phenomenex, Le Pecq, France) thermostated at 40°C with a mobile phase consisting of 0.5% formic acid and a methanol gradient delivered at a flow rate of 0.3 ml/min from 2 to 80%. The mass spectrometry detection was performed with a triple quadrupole tandem mass spectrometer Quantum Discovery with an ESI source (Thermo-Fisher Scientific) in positive ionization mode for TFV and FTC, and in negative mode for EFV.

PBMCs (N=12) of each sample were counted using a validated biochemical test as described (6).

Pgp or MRP function

In order to explain the differences on drug quantitation, Pgp and MRP functionality was assessed by measuring fluorescent dye efflux (0.1 µmol/l calcein-AM) in the presence or absence of specific inhibitors [2 µM cyclosporin A (Sigma Aldrich, St Quentin-Fallavier, France) and 30 µM MK571 (Calbiochem, VWR, Fontenay-sous-Bois, France)] for 30 min at 37°C. Cyclosporin A at the concentration of 2 µM is a specific Pgp inhibitor (34) and MK571 is a specific inhibitor of MRP-associated drug-resistance (ie MRPs 1, 2, 3) (16). Cells were then washed twice in cold PBS, fixed with CellFix (1:10, 400 µL, 4°C), and analyzed by flow cytometry.

Fluorescence due to calcein was plotted as a histogram of FL1 staining. Transporter function was quantified as described (45) by using the following equation:

$$\text{Percentage activity (\%)} = 100 - \frac{\text{Gmean}_{\text{calcein}}}{\text{Gmean}_{\text{inhibitor}}} \times 100$$

where $\text{Gmean}_{\text{calcein}}$ is the geometric mean fluorescence of calcein in the tested samples and $\text{Gmean}_{\text{inhibitor}}$ is the geometric median fluorescence of calcein in the presence of inhibitor.

Each experiment was performed on 7 different donors.

Transporter mRNA expression

In order to explain the effect of antiretroviral therapy on MRP functionality, we carried out further experiments on mRNA transporter expression. Following the 20-h antiretroviral treatment, efflux and influx transporter expression was determined by RT-PCR (N=3).

RNA was isolated using the GenEluteTM mammalian total RNA kit (Sigma Aldrich). Total RNA concentration and purity were then determined by measuring absorbance at 260 nm and 280 nm. The A260/A280 ratio ranged between 1.8 and 2. A sample of 0.5 µg of total RNA was converted to cDNA with random primers in a total volume of 10 µl using RT² first strand Kit (Superarray Bioscience

Corporation, Frederick, USA). The cDNA was diluted with distilled water to a volume of 100 µl. A volume of 2 µl was used for each primer set in a specific RT² Profiler PCR Array according to the manufacturer's protocol. The plates used for the analysis were ABC (*abcb1*, *abcc1*, *abcc2*, *abcc4*, *abcc5*, *abcc6*, *abcg2*) and SLC (*slc22A6*, *slc22A8*) transporters PCR array (catalogue number: CAPH-0468). Relative expression values were determined by the following rules: due to the inverse proportional relationship between the threshold cycle (CT) and the original gene expression level, and the doubling of the amount of product with every cycle, the expression level was described as: 2^{-CT} . Then, to normalize the expression level of a gene of interest to a housekeeping gene, the relative expression level was calculated as: $2^{-\Delta CT}$, where ΔCT is the difference of CT values for genes of interest and the housekeeping gene (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase, HPRT). If the CT was higher than 35, we considered the expression level too low to be applicable.

Direct inhibitory effect of drug on calcein accumulation

Direct drug inhibitory experiments were carried out in order to highlight the pharmacological mechanisms leading to intracellular drug concentrations. PBMCs (5×10^5 cells/ml) from healthy donors (N=6) were incubated with MRP inhibitor MK571 (30 µM) as a positive control, or with different concentrations of FTC, TFV or EFV [(0.5-10 µM), range of soluble and non-cytotoxic concentrations (49)], for 30 min at 37°C in 1 ml complete RPMI medium. Drug accumulation was initiated by the addition of calcein-AM (0.1 µM per 5 ml tube). Following 1-h incubation, cells were centrifuged (500 g, 5 min, 4°C), washed twice in cold PBS, then fixed with CellFix (1:10, 400 µl, 4°C) and analyzed by flow cytometry. Fluorescence due to calcein was followed in channel 1 (FL1) and plotted as a histogram of FL1 staining. The calcein accumulation after incubation with calcein-AM should be increased by the presence of MRP substrate or inhibitor because of competition or inhibition of calcein-AM efflux.

Statistics

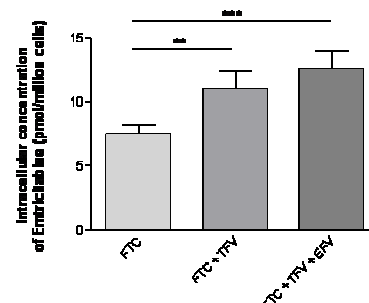
Data are expressed as the mean \pm SEM. GraphPad Prism® 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used to perform statistical analysis to highlight any statistically significant difference between the data groups. The significance of differences between groups and controls was evaluated by using a one-way ANOVA with a Dunnett's post-test or a two-tailed Student's t test. Differences between means were considered to be significant when the P-value was less than 0.05.

RESULTS

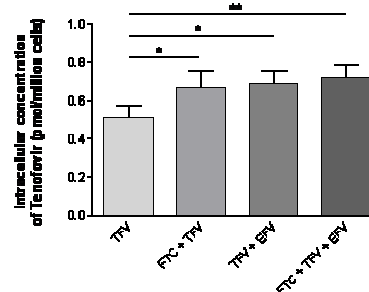
In vitro intracellular accumulation of antiretroviral drugs in PBMCs treated for 20 h in vitro

Drug concentrations were measured following the 20-h incubation. Compared with FTC alone, FTC concentration increased by $42.4 \pm 6.3\%$ when combined with TFV ($p=0.0002$), and $61.1 \pm 13.7\%$ when combined with TFV+EFV ($p=0.0007$) (Figure 1-A). Compared with TFV alone, TFV concentration increased by $30.0 \pm 8.4\%$ when combined with FTC ($p=0.0045$); $38.8 \pm 9.4\%$ when combined with EFV ($p=0.0030$); and $56.1 \pm 19.1\%$ when combined with FTC+EFV ($p=0.0142$) (Figure 1-B). Compared with EFV alone, EFV concentration does not statistically change when combined with TFV or with FTC+TFV (Figure 1-C).

1-A



1-B



1-C

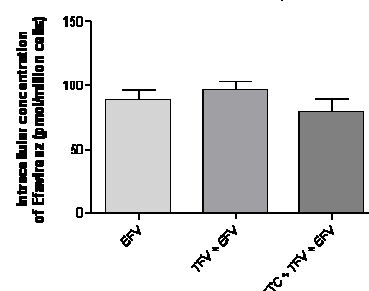


Figure 1:

Intracellular concentration of emtricitabine (A), tenofovir (B) or efavirenz (C), alone or combined (pmol/million cells). Data are expressed as means \pm SEM (n=12). The P values (*: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ns: nonsignificant) were determined by ANOVA with Dunnett's multiple comparison test for post hoc comparison of the results with vehicle control.

Effect of 20-h treatment on lymphocyte multidrug resistance transporter function

In order to explain the differences seen by drug quantitation alone or combined, we investigated efflux transporter function following the 20-h cell treatments. The percentage of MRP and Pgp activity was evaluated by measuring the effect of selective inhibitor of Pgp and MRPs (MK571 and cyclosporin A, respectively) on calcein-AM accumulation. Percentages of inhibition caused by 30 μ M MK571 or 2 μ M cyclosporin A are summarized in Table 1.

Cyclosporin A at the concentration of 2 μ M caused no statistically significant change in calcein-AM accumulation in all treated cells

For all drugs combined or alone, the MRP function decreases were statistically significant: $P=0.0040$ for FTC treatment, $P=0.0014$ for TFV, $P=0.0048$ for EFV, $P=0.0141$ for FTC+TFV, $P=0.0021$ for TFV+EFV and $P=0.0001$ for FTC+TFV+EFV.

TABLE 1: ABC transporter activity measured by the effect of selective inhibitor (2 μ M cyclosporin A or 30 μ M MK571) on calcein-AM accumulation

Treatment	Pgp activity	MRP activity
	Cyclosporine A 2 μ M	MK571 30 μ M
Vehicle (DMSO 0,2%)	31.84 \pm 3.42	32.20 \pm 3.63
FTC 5 μ M	32.29 \pm 3.99	20.98 \pm 3.22 **
TFV 5 μ M	32.03 \pm 4.46	17.39 \pm 3.47 **
EFV 5 μ M	29.85 \pm 4.15	16.59 \pm 1.84 **
FTC 5 μ M + TFV 5 μ M	29.90 \pm 5.35	19.64 \pm 2.88 *
TFV 5 μ M + EFV 5 μ M	30.01 \pm 4.05	9.73 \pm 1.69 **
FTC 5 μ M + TFV 5 μ M + EFV 5 μ M	27.53 \pm 5.09	10.88 \pm 3.63 ***

PBMCs are treated with 5 μ M emtricitabine (FTC), 5 μ M tenofovir (TFV) and 5 μ M efavirenz (EFV), alone or in combination, for 20 h. Data are represented as mean \pm SEM (N=7). The significance of differences between treated groups and vehicle control was evaluated using Student's t-test. A p-value < 0.05 was considered significant (*: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$).

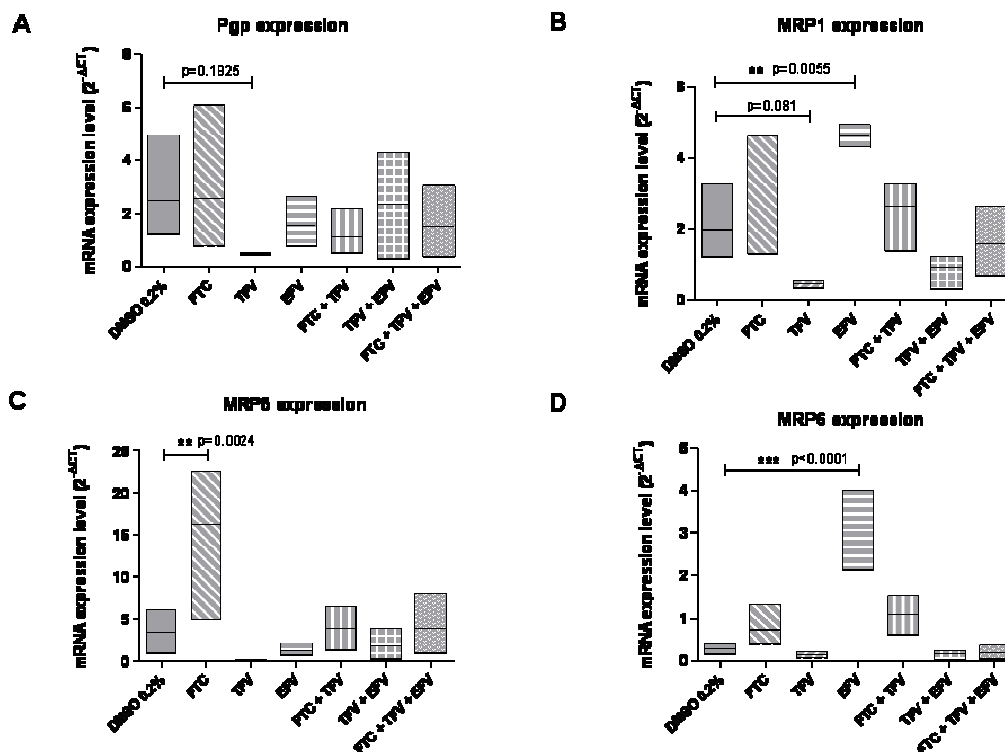
Expression of ABC and OAT transporter mRNA in response to cell treatment with antiretroviral drugs

Following the 20-h incubation with antiretroviral regimen, the transporter mRNA expression was investigated by semi-quantitative RT-PCR. We evaluated expression of the *mdr1*, *mrp1*, *mrp2*, *mrp4*, *mrp5*, *mrp6*, *slc22A6*, *slc22A8*, encoding for Pgp, MRP1, MRP2, MRP4, MRP5, MRP6, OAT1 and OAT3 respectively. All these transporters are thought to be involved in antiretroviral efflux. The housekeeping gene (HPRT) was not significantly modified by the treatments.

Treated or untreated cells had very low levels of *mrp2*, *mrp4*, *slc22A6* and *slc22A8* mRNA. For these genes, the CT was higher than 35. In our experimental system, the rank order of mRNA expression levels was *mrp5* \geq Pgp \geq *mrp1* \gg *mrp6*.

EFV, alone at the concentration of 5 μ M, induced *mrp1* and *mrp6*, which encode xenobiotic efflux transporters. For *mrp1*, mRNA level increased from 2.0 (control) to 4.6 (cells treated with EFV) ($P=0.0055$). For *mrp6*, mRNA level increased from 0.3 (control) to 3.2 (cells treated with EFV) ($P<0.0001$).

FTC, alone at the concentration of 5 μ M, induced *mrp5*, which encode the nucleoside/nucleotide efflux transporter MRP5. mRNA level increased from 3.3 (control) to 16.2 (cells treated with FTC) ($P=0.0024$). For all the studied transporters (Pgp, MRP1, MRP5 and MRP6), TFV tended to reduce mRNA expression. Pgp mRNA level decreased from 2.5 (control) to 0.5. MRP1 mRNA level decreased from 2.0 (control) to 0.45. MRP5 mRNA level decreased from 3.3 (control) to 0.1. MRP6 mRNA level decreased from 0.3 (control) to 0.1.

**Figure 2:**

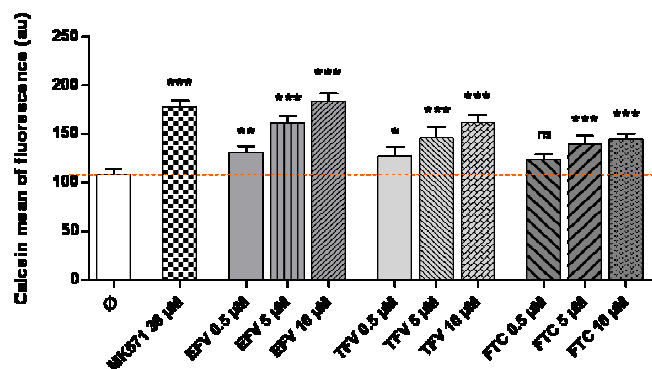
mRNA expression level of Pgp (A), MRP1 (B), MRP5 (C) and MRP6 (D) in peripheral blood mononuclear cells treated with emtricitabine (FTC), tenofovir (TFV), efavirenz (EFV), alone or combined. Data are expressed as a low-high bar graph; the horizontal line represents the mean (N=3). The P values (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ns: nonsignificant) were determined by ANOVA with Dunnett's multiple comparison test for post hoc comparison of the results with vehicle control.

Direct inhibitory effect of drug on calcein accumulation

Direct inhibition of calcein-AM extrusion was determined by measuring calcein fluorescence with or without MK571, as a positive control, or different doses of FTC, TFV and EFV (Figure 3).

With 30 μ M MK571, calcein accumulation was 63.86% higher than in the control.

EFV increased intracellular calcein accumulation in a concentration-dependent manner. EFV seemed to be the better inhibitor with an effect at 10 μ M similar to 30 μ M MK571 (68.95% higher than the control). TFV increased intracellular calcein accumulation in a concentration-dependent manner to 48.89% with 10 μ M TFV (N=6). FTC increased intracellular calcein accumulation in a concentration-dependent manner to 33.18% with 10 μ M FTC (N=6).

**Figure 3:**

Calcein assay assessing the concentration-dependent increase in intracellular fluorescence in lymphocytes treated with efavirenz (EFV), tenofovir (TFV), emtricitabine (FTC). The negative control was DMSO 0.2% and the positive control 30 μ M MK571. Data are expressed as mean \pm SEM (N=6). The P values (**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) were determined by ANOVA with Dunnett's multiple comparison test for post hoc comparison of the results with vehicle control.

DISCUSSION

Drug interactions in patients with HAART are often caused by more than one mechanism, such as mutation in HIV reverse transcriptase or protease, drug metabolism such as phosphorylation, or efflux transporter modulation. This shows the importance of knowing all the potential targets involved and considering their complex interplay for dose individualization (56). Very few studies have considered the effect of the combination of emtricitabine (FTC), tenofovir (TFV) and efavirenz (EFV) on their intracellular concentrations and ABC multidrug transporter modulation.

Twenty-hour cell treatment produced a significant increase in FTC and TFV levels, with each FTC+TFV, TFV+EFV or FTC+TFV+EFV combinations, compared with the levels seen with each individual drugs. Furthermore, dose-response curves were generated for each drug in the presence of rising concentration of the other drugs. We show an increasing intracellular concentration of TFV and FTC with rising doses of EFV. FTC concentration increased with rising concentration of TFV and *vice versa*. In all the cases, intracellular nucleoside concentration reached a plateau, from 1 μ M of EFV or 5 μ M of the other nucleosides (data not shown).

These results differ from those of Borroto-Esoda *et al.* (8) regarding TFV concentration combined with FTC in PBMCs but they are not inconsistent since these authors used PBMCs stimulated by phytohemagglutinin and interleukin-2. Stimulated PBMCs have high levels of phosphorylated metabolites and express different levels of efflux transporters (5,53). Probably due to a very slow phosphorylation in our inactivated experimental system, intracellular FTC and TFV triphosphorylated metabolite concentrations were around the lower limit of quantitation of our assay method used for NRTI-TP (44).

Regarding EFV, there was no change in EFV quantitation alone or in combination. This might be due to the intracellular/extracellular ratio which was very high (around 44-fold), possibly saturating efflux transporters. Alternatively EFV is possibly not a Pgp or MRP substrate (13,50).

In order to explain the increasing FTC and TFV concentrations in combination therapies, we suggest ABC transporter interaction. We investigated Pgp and MRP function, following the 20-h treatment with drug combinations. The percentage of MRP and Pgp activities was measured by the effect of selective inhibitor of Pgp and MRPs (MK571 and cyclosporin A, respectively) on calcein-AM accumulation. Calcein-AM is a well-established Pgp and MRP index substrate (41,55). It is a fluorogenic, highly lipid-soluble dye that rapidly penetrates the plasma membrane. Inside the cell, endogenous esterases produce the hydrophilic and fluorescent dye calcein, which cannot leave the cell via the plasma membrane (21). Whereas calcein-AM is a substrate of Pgp and MRP, calcein is not. Cyclosporin A at a concentration of 2 μ M is a

specific Pgp inhibitor (34) and 30 μ M MK571 a specific inhibitor of MRP associated drug-resistance (16). Using a functionality test with one substrate and two specific inhibitors, the present study provides evidence for a significant decrease in MRP, but not Pgp, function in lymphocytes treated for 20 h by FTC, TFV, and EFV, alone or in combination (Table 1).

MRP transporters could play a role in intracellular drug accumulation. However, they are not the only cause. For example, treatments with FTC, TFV and FTC+TFV had the same effect on MRP function, but FTC or TFV concentrations were higher in the combination therapy. Since nucleoside/nucleotide analogues are hydrophilic, they could enter cells by influx transporters, instead of passive diffusion. And these influx transporters, like members of the SLC family, could be modulated by drug combination therapies.

In order to investigate the effect of antiretroviral therapy on MRP functionality, we carried out further experiments on mRNA transporter expression and on direct transporter efflux inhibition by antiretroviral drugs.

In our experimental system, *mdr1*, *mrp1*, *mrp5* and *mrp6* mRNA were quantifiable, whereas *mrp2*, *mrp4*, *bcrp*, *oat1* and *oat3* mRNAs were not detectable. The mRNAs of *mdr1*, *mrp1* and *mrp5* have been demonstrated in PBMCs (monocytes and lymphocytes) (1,26,32). Expression levels of the other genes levels were very low in our experimental conditions.

Reduced MRP function was not related to decreased expression of *mrp1*, *mrp5* or *mrp6* mRNAs, except for TFV. A significant dissociation between expression and activity has been reported (1,12,39,57).

The nucleoside analogue FTC induced *mrp5* expression, which encodes the nucleoside and nucleotide transporter MRP5 (22,47,58). EFV induced *mrp1* and *mrp6* expression, which both encode xenobiotic transporters (4,11). TFV tended to alter *mdr1*, *mrp1*, *mrp5* and *mrp6* mRNA expression.

These results suggest a different regulation mechanism between transporters. Nuclear receptors, such as the androstane receptor (CAR) and the pregnane X receptor (PXR), play an important role in the transcriptional regulation and induction of several genes like *mdr1*, *mrp2* (27,51). In contrast, for *mrp1*, there are only a few studies which furthermore are controversial (28,37). The *mrp1* and *mrp6* gene promoters contain an Sp1-binding site, which is involved in the regulation of their transcription (25,40). The nuclear factor-E2 p45-related factor (Nrf-2), a transcription factor for the antioxidant responsive element, can be required for both constitutive and inducible expression of MRP1 (19). PXR is expressed in PBMCs (1); transcription factors Sp-1 and Nrf-2 are ubiquitously expressed in mammalian cells. EFV has recently been demonstrated to act as a strong ligand of CAR and PXR (14). No data are available for the other drugs.

Combination therapies did not affect transporter expression, probably due to regulation compensations between the different drugs.

Drug effect seen on MRP function was not caused by a MRP expression modulation. Therefore, we propose that it could be a direct effect on MRP transport. FTC, TFV and EFV increased calcein-AM accumulation in a concentration-dependent manner from 0.5 μ M to 10 μ M (Figure 3), suggesting the interaction of these compounds with MRP transporters as described (46,56).

In conclusion, this *in vitro* study reveals a benefit for a combination therapy like ATRIPLA, in term of FTC and TFV intracellular drug concentrations. However, there is always a balance between efficacy and toxicity/adverse effects, and a good combination therapy may require patient drug monitoring. This effect on drug concentration seems to be partly due to a decrease in MRP functionality, and particularly to direct drug interaction with members of the MRP family. We also provide evidence for different pathways of transcriptional expression modulation between efflux transporters.

Acknowledgments: We would like to thank the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA for financial support.

REFERENCES

- Albermann, N., F. H. Schmitz-Winnenthal, K. Z'graggen, C. Volk, M. M. Hoffmann, W. E. Haefeli, and J. Weiss. 2005. Expression of the drug transporters MDR1/ABCB1, MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, BCRP/ABCG2, and PXR in peripheral blood mononuclear cells and their relationship with the expression in intestine and liver. *Biochem.Pharmacol.* **70**:949-958.
- Arribas, J. R., A. L. Pozniak, J. E. Gallant, E. DeJesus, B. Gazzard, R. E. Campo, S. S. Chen, D. McColl, C. B. Holmes, J. Enejosa, J. J. Toole, and A. K. Cheng. 2007. Tenofovir Disoproxil Fumarate, Emtricitabine, and Efavirenz Compared With Zidovudine/Lamivudine and Efavirenz in Treatment-Naive Patients: 144-Week Analysis. *J Acquir.Immune.Defic.Syndr.*
- Bartlett, J. A., S. S. Chen, and J. B. Quinn. 2007. Comparative efficacy of nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors in combination with efavirenz: results of a systematic overview. *HIV.Clin.Trials* **8**:221-226.
- Belinsky, M. G., Z. S. Chen, I. Shchavezleva, H. Zeng, and G. D. Kruh. 2002. Characterization of the drug resistance and transport properties of multidrug resistance protein 6 (MRP6, ABCC6). *Cancer Res.* **62**:6172-6177.
- Belliard, A. M., S. Tardivel, R. Farinotti, B. Lacour, and C. Leroy. 2002. Effect of hr-IL2 treatment on intestinal P-glycoprotein expression and activity in Caco-2 cells. *J Pharm.Pharmacol.* **54**:1103-1109.
- Benech, H., F. Theodoro, A. Herbet, N. Page, D. Schlemmer, A. Pruvost, J. Grassi, and J. R. Deverre. 2004. Peripheral blood mononuclear cell counting using a DNA-detection-based method. *Anal.Biochem.* **330**:172-174.
- Berruet, N., S. Sentenac, D. Auchere, F. Gimenez, R. Farinotti, and C. Fernandez. 2005. Effect of efavirenz on intestinal p-glycoprotein and hepatic p450 function in rats. *J Pharm.Pharm.Sci.* **8**:226-234.
- Borrito-Esoda, K., J. E. Vela, F. Myrick, A. S. Ray, and M. D. Miller. 2006. In vitro evaluation of the anti-HIV activity and metabolic interactions of tenofovir and emtricitabine. *Antivir.Ther.* **11**:377-384.
- Chandler, B., L. Almond, J. Ford, A. Owen, P. Hoggard, S. Khoo, and D. Back. 2003. The effects of protease inhibitors and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors on p-glycoprotein expression in peripheral blood mononuclear cells in vitro. *J.Acquir.Immune.Defic.Syndr.* **33**:551-556.
- Chearskul, P., C. Rongkavilit, H. Al-Tatari, and B. Asmar. 2006. New antiretroviral drugs in clinical use. *Indian J.Pediatr.* **73**:335-341.
- Choudhuri, S. and C. D. Klaassen. 2006. Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *Int.J.Toxicol.* **25**:231-259.
- De, M. B., C. Dhooge, and J. Philippe. 1999. Discordance of P-glycoprotein expression and function in acute leukemia. *Adv.Exp.Med.Biol.* **457**:107-118.
- Dirson, G., C. Fernandez, P. Hindlet, F. Roux, M. German-Fattal, F. Gimenez, and R. Farinotti. 2006. Efavirenz does not interact with the ABCB1 transporter at the blood-brain barrier. *Pharm.Res.* **23**:1525-1532.
- Faucette, S. R., T. C. Zhang, R. Moore, T. Sueyoshi, C. J. Omiecinski, E. L. LeCluyse, M. Negishi, and H. Wang. 2007. Relative activation of human pregnane X receptor versus constitutive androstane receptor defines distinct classes of CYP2B6 and CYP3A4 inducers. *J.Pharmacol.Exp.Ther* **320**:72-80.
- Ford, J., E. R. Meaden, P. G. Hoggard, M. Dalton, P. Newton, I. Williams, S. H. Khoo, and D. J. Back. 2003. Effect of protease inhibitor-containing regimens on lymphocyte multidrug resistance transporter expression. *J.Antimicrob.Chemother.* **52**:354-358.
- Gekeler, V., W. Ise, K. H. Sanders, W. R. Ulrich, and J. Beck. 1995. The leukotriene LTD4 receptor antagonist MK571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **208**:345-352.
- Gottesman, M. M., C. Cardarelli, S. Goldenberg, T. Licht, and I. Pastan. 1998. Selection and maintenance of multidrug-resistant cells. *Methods Enzymol.* **292**:248-258.
- Hammer, S. M., M. S. Saag, M. Schechter, J. S. Montaner, R. T. Schooley, D. M. Jacobsen, M. A. Thompson, C. C. Carpenter, M. A. Fischl, B. G. Gazzard, J. M. Gatell, M. S. Hirsch, D. A. Katzenstein, D. D. Richman, S. Vella, P. G. Yeni, and P. A. Volberding. 2006. Treatment for adult HIV infection: 2006 recommendations of the International AIDS Society--USA panel. *Top.HIV.Med.* **14**:827-843.
- Hayashi, A., H. Suzuki, K. Itoh, M. Yamamoto, and Y. Sugiyama. 2003. Transcription factor Nrf2 is required for the constitutive and inducible expression of multidrug resistance-associated protein 1 in mouse embryo fibroblasts. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **310**:824-829.
- Higgins, C. F. 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu.Rev.Cell Biol.* **8**:67-113.
- Hollo, Z., L. Homolya, T. Hegedus, and B. Sarkadi. 1996. Transport properties of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in human tumour cells. *FEBS Lett.* **383**:99-104.
- Homolya, L., A. Varadi, and B. Sarkadi. 2003. Multidrug resistance-associated proteins: Export pumps for conjugates with glutathione, glucuronate or sulfate. *Biofactors* **17**:103-114.
- Huisman, M. T., J. W. Smit, H. R. Wiltshire, R. M. Hoetelmans, J. H. Beijnen, and A. H. Schinkel. 2001. P-glycoprotein limits oral availability, brain, and fetal penetration of saquinavir even with high doses of ritonavir. *Mol.Pharmacol.* **59**:806-813.
- Imaoka, T., H. Kusuvara, M. Adachi, J. D. Schuetz, K. Takeuchi, and Y. Sugiyama. 2007. Functional involvement of multidrug resistance-associated protein 4

- (MRP4/ABCC4) in the renal elimination of the antiviral drugs adefovir and tenofovir. *Mol.Pharmacol.* **71**:619-627.
25. **Jiang, Q., Y. Matsuzaki, K. Li, and J. Uitto.** 2006. Transcriptional regulation and characterization of the promoter region of the human ABCC6 gene. *J.Invest Dermatol.* **126**:325-335.
26. **Jorajuria, S., N. reুদ্ধre-Bosquet, F. Becher, S. Martin, F. Porcheray, A. Garrigues, A. Mabondzo, H. Benech, J. Grassi, S. Orlowski, D. Dormont, and P. Clayette.** 2004. ATP binding cassette multidrug transporters limit the anti-HIV activity of zidovudine and indinavir in infected human macrophages. *Antivir.Ther* **9**:519-528.
27. **Kast, H. R., B. Goodwin, P. T. Tarr, S. A. Jones, A. M. Anisfeld, C. M. Stoltz, P. Tontonoz, S. Kliewer, T. M. Willson, and P. A. Edwards.** 2002. Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J.Biol.Chem.* **277**:2908-2915.
28. **Kauffmann, H. M., S. Pfannschmidt, H. Zoller, A. Benz, B. Vorderstemann, J. I. Webster, and D. Schrenk.** 2002. Influence of redox-active compounds and PXR-activators on human MRP1 and MRP2 gene expression. *Toxicology* **171**:137-146.
29. **Killingley, B. and A. Pozniak.** 2007. The first once-daily single-tablet regimen for the treatment of HIV-infected patients. *Drugs Today (Barc.)* **43**:427-442.
30. **Klein, I., B. Sarkadi, and A. Varadi.** 1999. An inventory of the human ABC proteins. *Biochim.Biophys.Acta* **1461**:237-262.
31. **Krishna, R. and L. D. Mayer.** 2000. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur.J.Pharm.Sci.* **11**:265-283.
32. **Laupeze, B., L. Amiot, L. Payen, B. Drenou, J. M. Grosset, G. Lehne, R. Fauchet, and O. Fardel.** 2001. Multidrug resistance protein (MRP) activity in normal mature leukocytes and CD34-positive hematopoietic cells from peripheral blood. *Life Sci.* **68**:1323-1331.
33. **Lee, C. G., M. M. Gottesman, C. O. Cardarelli, M. Ramachandra, K. T. Jeang, S. V. Ambudkar, I. Pastan, and S. Dey.** 1998. HIV-1 protease inhibitors are substrates for the MDR1 multidrug transporter. *Biochemistry* **37**:3594-3601.
34. **Legrand, O., G. Simonin, J. Y. Perrot, R. Zittoun, and J. P. Marie.** 1998. Pgp and MRP activities using calcein-AM are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia patients. *Blood* **91**:4480-4488.
35. **Levi M and Pruvost A.** 2006. Abstr. 7th International Workshop on Clinical Pharmacology of HIV Therapy, abstr. 69. Sensitive HPLC-ESI-MS/MS method for the simultaneous quantitative determination of Abacavir, Lamivudine and Tenofovir in human plasma.
36. **Loscher, W. and H. Potschka.** 2005. Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx.* **2**:86-98.
37. **Magnarin, M., M. Morelli, A. Rosati, F. Bartoli, L. Candussio, T. Giralaldi, and G. Decorti.** 2004. Induction of proteins involved in multidrug resistance (P-glycoprotein, MRP1, MRP2, LRP) and of CYP 3A4 by rifampicin in LLC-PK1 cells. *Eur.J.Pharmacol.* **483**:19-28.
38. **Masuhr, A., M. Mueller, V. Simon, T. Zwingers, M. Kurowski, H. Jessen, E. Lauenroth-Mai, A. Moll, D. Schranz, C. Moecklinghoff, and K. Arasteh.** 2002. Predictors of treatment failure during highly active antiretroviral therapy (racing trial). *Eur.J.Med.Res.* **7**:341-346.
39. **Meaden, E. R., P. G. Hoggard, S. H. Khoo, and D. J. Back.** 2002. Determination of P-gp and MRP1 expression and function in peripheral blood mononuclear cells in vivo. *J.Immunol.Methods* **262**:159-165.
40. **Muredda, M., K. Nunoya, R. A. Burtch-Wright, E. U. Kurz, S. P. Cole, and R. G. Deeley.** 2003. Cloning and Characterization of the Murine and Rat mrp1 Promoter Regions. *Mol.Pharmacol.* **64**:1259-1269.
41. **Ozben, T.** 2006. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS Lett.* **580**:2903-2909.
42. **Perloff, M. D., L. L. Von Moltke, J. E. Marchand, and D. J. Greenblatt.** 2001. Ritonavir induces P-glycoprotein expression, multidrug resistance-associated protein (MRP1) expression, and drug transporter-mediated activity in a human intestinal cell line. *J.Pharm.Sci.* **90**:1829-1837.
43. **Pozniak, A. L., J. E. Gallant, E. DeJesus, J. R. Arribas, B. Gazzard, R. E. Campo, S. S. Chen, D. McColl, J. Enejosa, J. J. Toole, and A. K. Cheng.** 2006. Tenofovir disoproxil fumarate, emtricitabine, and efavirenz versus fixed-dose zidovudine/lamivudine and efavirenz in antiretroviral-naïve patients: virologic, immunologic, and morphologic changes--a 96-week analysis. *J Acquir.Immune.Defic.Syndr.* **43**:535-540.
44. **Pruvost, A., F. Theodoro, L. Agrofoglio, E. Negrodo, and H. Benech.** 2008. Specificity enhancement with LC-positive ESI-MS/MS for the measurement of nucleotides: application to the quantitative determination of carbovir triphosphate, lamivudine triphosphate and tenofovir diphosphate in human peripheral blood mononuclear cells. *J.Mass Spectrom.* **43**:224-233.
45. **Rautio, J., J. E. Humphreys, L. O. Webster, A. Balakrishnan, J. P. Keogh, J. R. Kunta, C. J. Serabjit-Singh, and J. W. Polli.** 2006. In vitro p-glycoprotein inhibition assays for assessment of clinical drug interaction potential of new drug candidates: a recommendation for probe substrates. *Drug Metab Dispos.* **34**:786-792.
46. **Ray, A. S., T. Cihlar, K. L. Robinson, L. Tong, J. E. Vela, M. D. Fuller, L. M. Wieman, E. J. Eisenberg, and G. R. Rhodes.** 2006. Mechanism of active renal tubular efflux of tenofovir. *Antimicrob.Agents Chemother.* **50**:3297-3304.
47. **Ritter, C. A., G. Jedlitschky, S. H. Meyer Zu, M. Grube, K. Kock, and H. K. Kroemer.** 2005. Cellular export of drugs and signaling molecules by the ATP-binding cassette transporters MRP4 (ABCC4) and MRP5 (ABCC5). *Drug Metab Rev.* **37**:253-278.
48. **Seelig, A., X. L. Blatter, and F. Wohnsland.** 2000. Substrate recognition by P-glycoprotein and the multidrug resistance-associated protein MRP1: a comparison. *Int.J.Clin.Pharmacol.Ther.* **38**:111-121.
49. **Storch, C. H., D. Theile, H. Lindenmaier, W. E. Haefeli, and J. Weiss.** 2007. Comparison of the inhibitory activity of anti-HIV drugs on P-glycoprotein. *Biochem.Pharmacol.* **73**:1573-1581.
50. **Stormer, E., L. L. Von Moltke, M. D. Perloff, and D. J. Greenblatt.** 2002. Differential modulation of P-glycoprotein expression and activity by non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors in cell culture. *Pharm.Res.* **19**:1038-1045.
51. **Synold, T. W., I. Dussault, and B. M. Forman.** 2001. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nat.Med.* **7**:584-590.
52. **Uwai, Y., H. Ida, Y. Tsuji, T. Katsura, and K. Inui.** 2007. Renal transport of adefovir, cidofovir, and tenofovir by SLC22A family members (hOAT1, hOAT3, and hOCT2). *Pharm.Res.* **24**:811-815.
53. **Veau, C., L. Faivre, S. Tardivel, M. Soursac, H. Banide, B. Lacour, and R. Farinotti.** 2002. Effect of interleukin-2 on intestinal P-glycoprotein expression and functionality in mice. *J Pharmacol.Exp.Ther.* **302**:742-750.
54. **Vishnuvardhan, D., L. L. Moltke, C. Richert, and D. J. Greenblatt.** 2003. Lopinavir: acute exposure inhibits P-glycoprotein; extended exposure induces P-glycoprotein. *AIDS* **17**:1092-1094.
55. **Weiss, J., S. M. Dormann, M. Martin-Facklam, C. J. Kerpen, N. Ketabi-Kiyanvash, and W. E. Haefeli.** 2003.

Inhibition of P-glycoprotein by newer antidepressants. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **305**:197-204.

56. **Weiss, J., D. Theile, N. Ketabi-Kiyanvash, H. Lindenmaier, and W. E. Haefeli.** 2007. Inhibition of MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, and MRP3/ABCC3 by nucleoside, nucleotide, and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Drug Metab Dispos.* **35**:340-344.

57. **Weiss, J., N. Weis, N. Ketabi-Kiyanvash, C. H. Storch, and W. E. Haefeli.** 2008. Comparison of the

induction of P-glycoprotein activity by nucleotide, nucleoside, and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Eur.J.Pharmacol.* **579**:104-109.

58. **Wijnholds, J., C. A. Mol, D. L. van, H. M. de, G. L. Scheffer, F. Baas, J. H. Beijnen, R. J. Scheper, S. Hatse, C. E. De, J. Balzarini, and P. Borst.** 2000. Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A* **97**:7476-7481.

2- Résultats complémentaires

2-1- Expression protéique des transporteurs Pgp et MRP1

Après 20 h de traitement avec les différentes combinaisons thérapeutiques associant FTC, TFV et EFV, l'expression de la Pgp et de la MRP1 sont mesurées par immunofluorescence directe en cytométrie de flux. Les résultats sont exprimés en moyenne d'intensité de fluorescence, normalisée par le contrôle isotypique.

En comparaison avec le témoin négatif (cellules traitées avec 0.2% de DMSO), les cellules traitées par les molécules seules ou bien en association ne montrent pas de changement significatif de l'expression de la Pgp ou de la MRP1 dans les lymphocytes ou dans les CMSPs totaux (N=5).

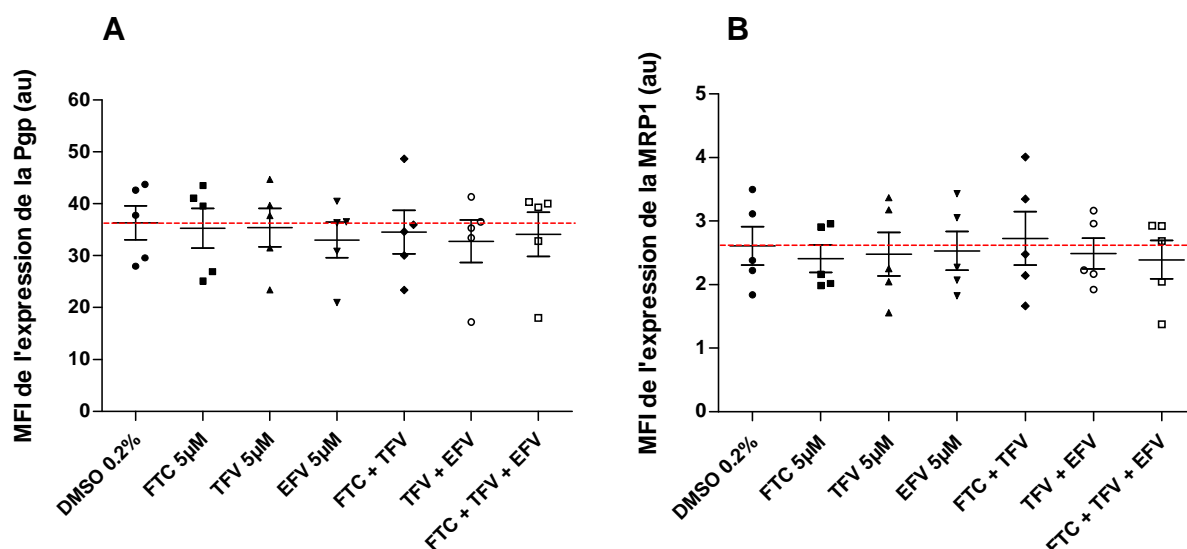


Figure 44 : Effet des différents traitements (FTC, TFV, EFV, FTC+TFV, TFV+EFV, FTC+TFV+EFV) sur l'expression des transporteurs dans les lymphocytes

A- Pgp

B- MRP1

2-2- Effet dose sur les concentrations de médicaments en association

Afin de voir si l'effet observé sur les concentrations intracellulaires de FTC et TFV étaient concentration-dépendant, nous avons réalisé différents effets doses en faisant varier les concentrations d'une seule molécule (N=5).

Les concentrations de FTC et de TFV augmentent avec des doses croissantes d'EFV. La concentration de FTC augmente avec des doses croissantes de TFV *et vice versa*. Les concentrations intracellulaires de nucléosides atteignent un plateau commençant à 1 μM d'EFV ou 5 μM des autres nucléosides.

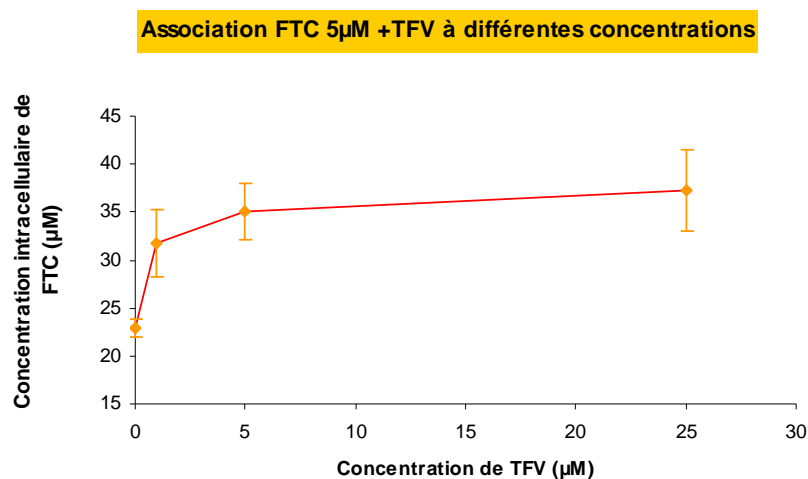


Figure 45 : Concentration intracellulaire de FTC dosé en LC-MS/MS, en association avec le TFV [à différentes concentrations (1, 5 et 25 μM)]

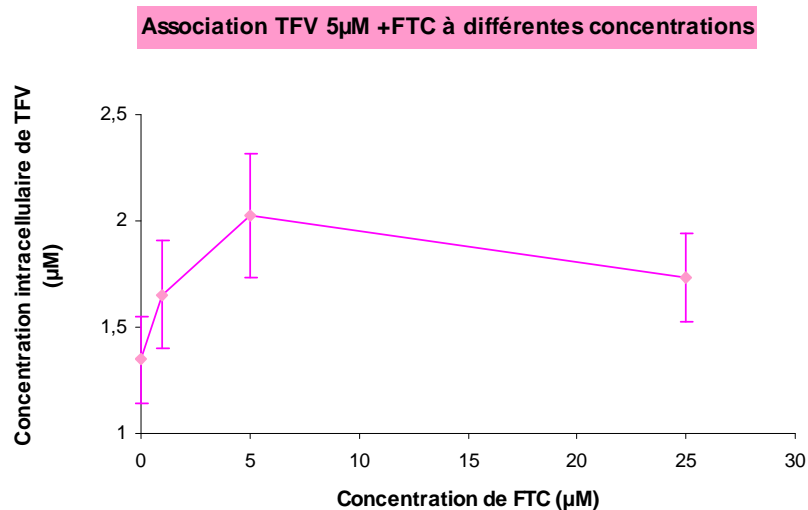


Figure 46 : Concentration intracellulaire de TFV dosé en LC-MS/MS, en association avec le FTC [à différentes concentrations (1, 5 et 25 μM)]

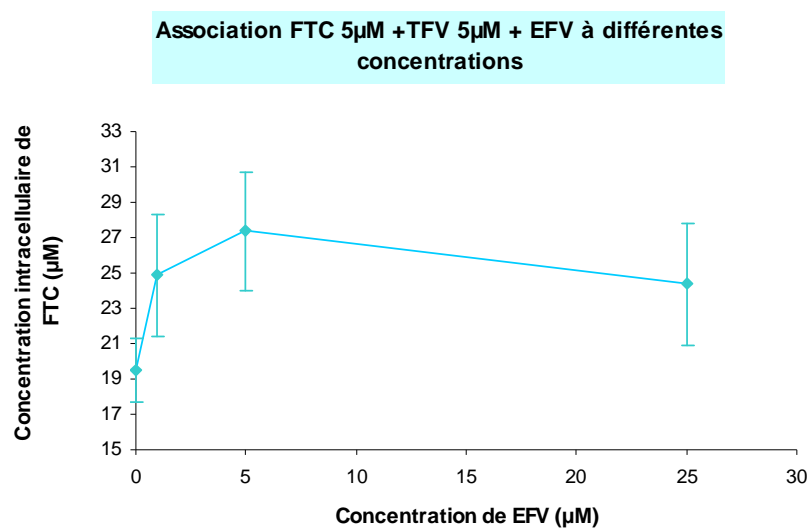


Figure 47 : Concentration intracellulaire de FTC dosé en LC-MS/MS, en association avec le TFV et l'EFV [à différentes concentrations (1, 5 et 25 μ M)]

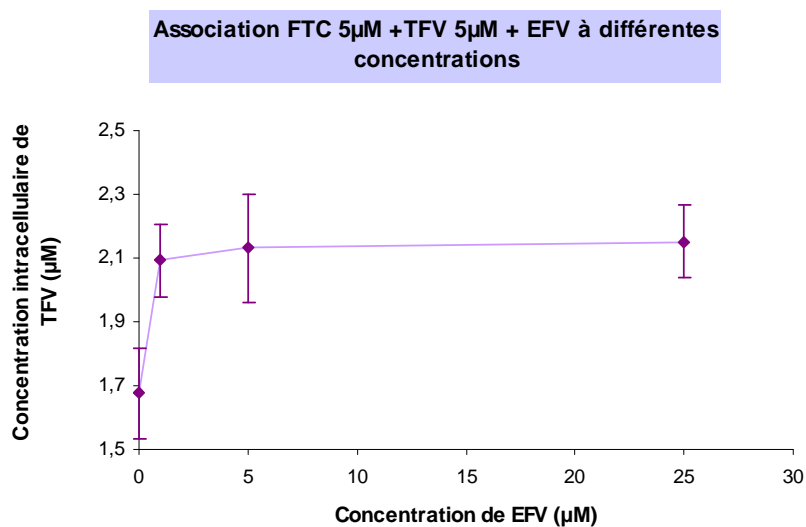


Figure 48 : Concentration intracellulaire de TFV dosé en LC-MS/MS, en association avec le FTC et l'EFV [à différentes concentrations (1, 5 et 25 μ M)]

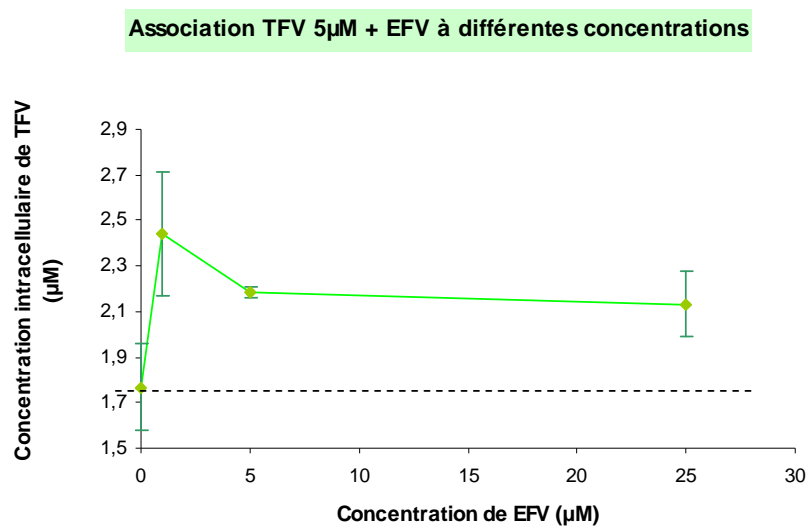


Figure 49 : Concentration intracellulaire de TFV dosé en LC-MS/MS, en association avec l'EFV [à différentes concentrations (1, 5 et 25 μ M)]

3- Discussion

Les interactions médicamenteuses chez les patients sous multi-thérapies antirétrovirales sont souvent causées par plus d'un mécanisme, tels que les mutations de la transcriptase inverse ou de la protéase du VIH, le métabolisme des médicaments, ou la régulation des transporteurs d'efflux. Il est donc important de connaître les cibles pharmacologiques potentielles impliquées, et de considérer leur possible interconnexion pour l'individualisation des doses administrées (Weiss *et al.*, 2007-b).

Très peu d'études se sont intéressées à l'effet de l'association FTC, TFV et EFV, sur leurs concentrations intracellulaires et sur la régulation des transporteurs ABC.

Vingt heures de traitement avec les combinaisons thérapeutiques a engendré une augmentation significative des concentrations de FTC et TFV, en double (FTC+TFV et TFV+EFV) ou en triple (FTC+TFV+EFV) associations, comparé aux concentrations observées avec les médicaments seuls. Ces résultats ont été confirmés par les courbes d'effet dose obtenus pour le FTC et le TFV, en présence de concentrations croissantes des autres médicaments.

Concernant les concentrations de TFV lorsqu'il est associé au FTC, ces données sont différentes de celles de l'équipe de Borroto-Esoda, mais ne sont pas incohérentes. En effet, les auteurs ne voient aucune différence de concentration du TFV qu'il soit associé ou non avec le FTC, dans des CMSPs stimulés par la phytohémataglutinine et l'interleukine 2 (Borroto-Esoda *et al.*, 2006). Nous n'avons pas voulu utiliser de cellules stimulées car elles expriment des niveaux différents de transporteurs d'efflux (Belliard *et al.*, 2002 ; Veau *et al.*, 2002), ainsi que de hauts niveaux de métabolites phosphorylés. Nous voulions seulement voir l'interaction des molécules mères avec les transporteurs présents à la surface des cellules. Les résultats observés par Borroto-Esoda peuvent également s'expliquer par le fait que l'expérience a été réalisée sur seulement deux patients, ce qui est très peu étant donnée la grande variabilité interindividuelle.

Probablement à cause du bas niveau de phosphorylation dans notre système inactivé, les concentrations intracellulaires de FTC et TFV triphosphorylés ont été trouvées autour de la limite de quantification de la méthode de dosage des INTI-TP disponible au laboratoire (Pruvost *et al.*, 2008). Il aurait été intéressant de pouvoir doser ces métabolites qui pourraient également être substrats des MRPs, transporteurs d'anions. Il a été montré que les MRP4 et MRP5 pouvaient augmenter l'efflux d'analogues nucléosidiques phosphorylés utilisés dans les thérapies anti-cancer et anti-VIH, tels que les monophosphates thiopurines (Wielinga *et al.*, 2002), le PMEA et l'AZT-MP (Schuetz *et al.*, 1999). De plus, les traitements pourraient également moduler les enzymes telles que les kinases, et pourraient influencer les concentrations de médicaments phosphorylés (Ray, 2005).

Concernant les concentrations intracellulaires d'EFV, il n'y a aucun changement qu'il soit seul ou bien en double ou triple association avec le FTC ou le TFV. Ceci pourrait être dû au fait que le ratio concentrations intracellulaire / extracellulaire est très élevé (environ 44 fois plus haut), pouvant ainsi saturer les transporteurs d'efflux présents au niveau des CMSPs. Il serait également possible que l'EFV ne soit pas substrat de ces transporteurs, comme cela a déjà été montré pour la Pgp (Dirson *et al.*, 2006 ; Stormer *et al.*, 2002).

Dans le but d'expliquer les concentrations croissantes de FTC et TFV dans les combinaisons thérapeutiques, nous avons fait l'hypothèse d'une interaction avec les transporteurs d'efflux. Nous avons recherché la fonctionnalité des transporteurs Pgp et MRPs, après 20 h de traitement avec les différentes combinaisons médicamenteuses. En utilisant un test de fonctionnalité avec un substrat (la calcéine-AM) et deux inhibiteurs spécifiques (cyclosporine A et MK571), nous avons mis en évidence une diminution du pourcentage d'activité des MRPs, mais pas de la Pgp, dans les cellules traitées par le FTC, le TFV, l'EFV, seuls ou bien associés, par rapport au contrôle (0.2% DMSO).

Les transporteurs MRPs pourraient donc jouer un rôle dans l'accumulation intracellulaire des antirétroviraux. Cependant, cela ne semble pas être la seule raison. En effet, pour les traitements avec le FTC, le TFV et l'association FTC+TFV, il y a quasiment le même effet sur la fonctionnalité des MRPs et pourtant les concentrations intracellulaires sont plus élevées dans le cas de la double association. Parce que les analogues nucléosidiques/nucléotidiques sont hydrophiles, ils pourraient pénétrer dans la cellule par des transporteurs d'influx et non par diffusion passive (Ray, 2005). Et ces derniers pourraient également être soumis à des régulations lors des diverses combinaisons médicamenteuses.

Pour expliquer l'effet des thérapies anti-VIH sur la fonctionnalité des MRPs, nous avons réalisé des expériences complémentaires sur l'expression des ARNm des transporteurs, ainsi que sur l'interaction directe des médicaments avec les transporteurs.

Dans notre système expérimental, les ARNm des gènes *mdr1*, *mrp1*, *mrp5* et *mrp6* sont quantifiables, alors que ceux des gènes *mrp2*, *mrp4*, *bcrp*, *oat1* et *oat3* ne sont pas détectables (les cycles de PCR sont dans ce cas-ci, au-delà de 35). Les ARNm des gènes *mdr1*, *mrp1* et *mrp5* ont été mis en évidence précédemment dans les CMSPs (lymphocytes et monocytes) (Albermann *et al.*, 2005, Laupèze *et al.*, 2001 ; Jorajuria *et al.*, 2004-a). La MRP2 et la BCRP ont été mis en évidence également dans les CMSPs (Albermann *et al.*, 2005 ; Janneh *et al.*, 2005) mais ne sont quantifiables dans nos conditions expérimentales, les CMSPs issues de l'Etablissement Français du sang ont 48 h et sont mis en culture pendant 20 h supplémentaires.

Le FTC, analogue nucléosidique, induit l'expression du gène *mrp5*, qui code pour le transporteur de nucléosides et nucléotides MRP5 (Homolya *et al.*, 2003 ; Ritter *et al.*, 2005 ; Wijnholds *et al.*, 2000).

L'EFV induit l'expression des gènes *mrp1* et *mrp6*, qui codent pour des transporteurs de xénobiotiques (Belinsky *et al.*, 2002 ; Choudhuri et Klaassen, 2006). Le TFV, lui, tend à réduire l'expression de tous les transporteurs présents, *mdr1*, *mrp1*, *mrp5* et *mrp6*. Ces résultats suggèrent un mécanisme de régulation différent entre les différents transporteurs.

Cependant, au niveau de l'expression protéique, nous n'avons observé aucune différence entre les cellules traitées ou contrôle, ainsi qu'entre les différents traitements. Ceci suggère qu'il n'y a pas de corrélation entre l'expression transcriptionnelle et l'expression protéique des transporteurs étudiés (Bergrenn *et al.*, 2007), et qu'interviennent sans doute d'autres niveaux de régulation post-transcriptionnel et traductionnel.

Les combinaisons thérapeutiques associant FTC, TFV et EFV n'affectent pas l'expression des gènes des transporteurs étudiés, ceci pourrait être dû à des phénomènes de compensations de régulation entre les différents médicaments.

L'effet des médicaments observé sur la fonctionnalité des MRPs, n'est donc pas dû à une modulation de l'expression génique ou protéique, mais à une interaction directe des médicaments avec ces transporteurs. En effet, le FTC, le TFV et l'EFV augmentent de façon concentration-dépendante l'efflux d'un substrat des MRPs, la calcéïne-AM. Cette interaction avait été démontré précédemment sur des lignées MDCKII surexprimant les différentes MRPs (Ray *et al.*, 2006 ; Weiss *et al.*, 2007-a).

En conclusion, cette étude *in vitro* a permis de montrer un bénéfice pour une combinaison thérapeutique telle qu'ATRIPLA, en termes de concentrations intracellulaires pour le FTC et le TFV. Cependant, il existe un équilibre fragile entre efficacité et toxicité. Si les concentrations sont trop élevées, ne risquent-elles pas de devenir toxiques et de multiplier les effets secondaires ?

Dans ce contexte, nous avons débuté une étude *in vivo* chez des patients infectés par le VIH-1 et suivis à l'hôpital Saint-Antoine, dans le service du Pr. Girard. Le but de ce travail est d'évaluer chez ces patients faisant l'objet d'un changement de traitement et suivis au temps 0 et après 1, 3 et 6 mois de traitement, l'influence de l'emtricitabine et/ou du tenofovir sur :

- les concentrations plasmatiques et dans les CMSPs des deux NRTIs (emtricitabine & tenofovir) et leurs métabolites phosphorylés (FTC-TP et TFV-DP) ; des IPs (RTV, LPV, ATV) ainsi que celles de l'efavirenz
- l'expression de la Pgp, MRPs et BCRP dans les cellules mononucléées du sang périphérique (CMSPs). L'expression des protéines d'efflux sera aussi corrélée à la charge virale plasmatique

L'objectif est donc, d'analyser les comportements mutuels des molécules, ritonavir, ténofovir et emtricitabine, reconnues ou non par les transporteurs. L'efficacité croissante des associations

antirétrovirales pourrait trouver une origine dans l'importance des concentrations intracellulaires des IPs (e.i. RTV, LPV, ATV), des NNRTIs (e.i. EFV) et/ou des NRTIs (FTC, TFV). A l'inverse, des échecs pourraient s'expliquer par des concentrations intracellulaires faibles de ces composés.

Chapitre 3

Effet de l'atazanavir sur les transporteurs ABC aux niveaux central et périphérique Passage de l'atazanavir à travers un modèle *in vitro* de BHE

Ce travail a fait l'objet d'un article accepté dans *AIDS Research and Human Retroviruses* (3 mai 2008) et ayant pour titre :

Comparison of ABC transporter modulation by atazanavir in lymphocytes and human brain endothelial cells: ABC transporters are involved in the atazanavir-limited passage across an *in vitro* human model of the blood-brain barrier

Il a également été présenté au congrès suivant :

11th European AIDS Conference, Madrid, 24-27 octobre 2007, Poster 3.2-03

1- Introduction

L'objectif de cette étude a été de comparer l'effet de l'ATV sur l'expression et la fonctionnalité des transporteurs d'efflux dans les lymphocytes humains (au niveau de la circulation périphérique) et dans les cellules endothéliales cérébrales humaines (au niveau du système central), ainsi que de déterminer si les interactions de l'ATV avec les transporteurs d'efflux pouvaient limiter son passage à travers la BHE. Dans cette optique, nous avons utilisé le modèle *in vitro* de BHE humaine récemment publié et validé au laboratoire, susceptible de prédire les transports passif et actif de molécules dans le SNC (Josserand *et al.*, 2006 ; Megard *et al.*, 2002).

Cette étude comparative nous a semblé pertinente étant donnés les différents mécanismes de régulation, les différents niveaux d'expression des transporteurs, des facteurs de transcription, existant au niveau central et au niveau périphérique.

Les données cliniques et biologiques chez les sujets séropositifs pour le VIH-1 montrent que le SNC est un organe cible de cette infection, à la fois en tant que réservoir viral mais aussi lieu de réplication virale. Environ 30% des patients sidéens développent une encéphalopathie à VIH-1, découlant de la neurotoxicité du virus dans le SNC. Si le virus arrive à entrer dans le SNC, ce n'est pas le cas des

médicaments. L'obstacle majeur dans la découverte et le développement de ces nouveaux candidats médicaments reste leur impossibilité à traverser la BHE, de part la présence, à ce niveau, de transporteurs d'efflux, Pgp, MRPs et BCRP (Eisenblatter *et al.*, 2003 ; Lipton et Gendelman, 1995).

A quelques exceptions près, tous les IPs ont été décrits comme substrats de la Pgp, à la fois au niveau de la BHE mais aussi au niveau d'autres cellules (Washington *et al.*, 1998 ; Kim *et al.*, 1998 ; Polli *et al.*, 1999 ; Jones *et al.*, 2001 ; Van der Sandt *et al.*, 2001 ; Megard *et al.*, 2002 ; Park et Sinko, 2005 ; Agarwal *et al.*, 2007 ; Janneh *et al.*, 2007 ; Roucairol *et al.*, 2007). Leurs propriétés physico-chimiques (lipophilie, poids moléculaire, liaison hydrogène...) semblent favoriser les interactions avec la Pgp, et ont été décrites comme essentielles pour qu'une molécule soit inductrice, inhibitrice ou substrat des protéines d'efflux (Seelig *et al.*, 2000).

In vitro, quelques études ont montré que l'atazanavir était capable d'induire ou d'inhiber l'expression et la fonctionnalité de la Pgp, avec différents résultats suivant le type cellulaire et la dose utilisée. Cependant, aucune étude n'a été réalisée sur l'ATV en tant qu'inducteur ou inhibiteur de la Pgp et des autres protéines d'efflux au niveau de la barrière hémato-encéphalique, que ce soit *in vivo* ou *in vitro*. De plus, aucune donnée sur le transport de l'ATV à travers la BHE n'a été décrite. Des expériences concernant la régulation de l'expression et de la fonctionnalité de la Pgp et des MRPs pourraient permettre de comprendre et d'évaluer son réel impact sur le transport de l'ATV à travers la BHE.

Les résultats obtenus démontrent qu'à la différence des cellules endothéliales cérébrales, dans les lymphocytes, l'atazanavir n'a aucun effet sur l'expression protéique des transporteurs Pgp et MRP1. Nous avons tout de même observé une augmentation de la fonctionnalité de la Pgp, à la fois dans les cellules endothéliales cérébrales et dans les lymphocytes.

En utilisant le modèle *in vitro* de BHE humaine, nous avons confirmé l'interaction de l'atazanavir avec la Pgp, et nous avons montré sa prise en charge par les MRPs et la BCRP.

ARTICLE 3

Comparison of ABC transporter modulation by atazanavir in lymphocytes and human brain endothelial cells: ABC transporters are involved in the atazanavir-limited passage across an in vitro human model of the blood-brain barrier

AIDS Research and Human Retroviruses

AIDS Research and Human Retroviruses

Comparison of ABC transporter modulation by atazanavir in lymphocytes and human brain endothelial cells: ABC transporters are involved in the atazanavir-limited passage across an in vitro human model of the blood-brain barrier

Laurence Bousquet ^{1,3}, Camille Roucairol ^{1,2}, Alexandra Hembury ¹, Marie-Claire Nevers ¹, Christophe Créminon ¹, Robert Farinotti ^{3,4}, Aloïse Mabondzo ¹

1- CEA, iBiTec-S, Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse, Gif-sur-Yvette, France

2- Université de Nice Sophia Antipolis, Laboratoire de Chimie des Molécules Bioactives et Arômes UMR 6001, Nice, France

3- Université Paris Sud, Pharmacie Clinique, EA 2706, Barrières et Passage des Médicaments, Châtenay-Malabry, France

4- Pharmacie, hôpital Pitié-Salpêtrière, Assistance publique des hôpitaux de Paris, Paris, France

Efflux pumps, P-glycoprotein (P-gp), multidrug resistance-associated proteins (MRPs) and breast cancer resistance protein (BCRP), have been shown to extrude HIV protease inhibitors from cells. These transporters are present on many barrier sites such as the blood-brain barrier (BBB) and on many circulating cells such as lymphocytes; and could reduce protease inhibitor concentration in sanctuary or HIV-1 target sites.

This study compares the potential of the anti-retroviral drug atazanavir to modulate P-gp and MRP expression and function in total lymphocytes and in human fetal brain endothelial cells (HBMECs). We address the question of atazanavir transport across the human BBB.

Following incubation with atazanavir, P-gp and MRP1 expression was determined by direct immunofluorescence. Transporter function was assessed by measuring fluorescent dye efflux, either with or without specific inhibitors. Atazanavir substrate properties were determined by transport quantification through a validated in vitro human BBB model.

Our results show that, in contrast to HBMECs, in lymphocytes, atazanavir has no effect on MRP1 and P-gp expression. However, there were overall changes in P-gp function increasing its activity, in lymphocytes and HBMECs. Using the in vitro human BBB model, we confirm the interaction of atazanavir with P-gp, MRPs and BCRP in preventing its passage across this barrier and thus its entry into the central nervous system.

Many new drugs that act on the central nervous system (CNS) show exceptional therapeutic promise due to their high potency at the target site, but lack general efficacy when administered systemically. Treatment failure or loss of efficacy may stem from undesirable drug-drug interactions. In many cases, the problem is failure to cross the blood-brain barrier (BBB) due to the presence of efflux transporters, such as ATP-binding cassette (ABC) transporters [P-glycoprotein (P-gp, ABCB1), multidrug resistance associated proteins (MRPs, ABCC1-7), breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2)] ^{1, 2}, and this is a major hindrance to the discovery and development of CNS drugs. However, inhibition of efflux proteins may enhance transport of antiretroviral agents and more particularly HIV-1 protease inhibitors (PIs) through the BBB ^{3, 4, 5, 6} and may be advantageous in treating CNS diseases, such as HIV encephalitis ^{7, 8}.

With a few exceptions, all PIs have been described as P-gp substrates, either at the BBB or in other barriers, as may be expected given that the chemical and physical properties (lipophilicity,

molecular weight, H bonding) favor interactions with P-gp. These properties have been reported as essential for drugs to be either modulators or substrates of P-gp and other efflux proteins⁹. For instance, a significant increase in P-gp functionality was described in LS180V cells exposed to high concentrations of ritonavir ¹⁰ or chronically exposed to lopinavir ¹¹, with a reduction in accumulation of the P-gp substrate, rhodamine 123. Extended exposure of bovine brain microvessel endothelial cells to ritonavir caused a concentration-dependent increase in P-gp expression and activity ¹². An increase in P-gp expression was reported in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) treated with nelfinavir ^{13, 14}. Substrate recognition similar to that described for P-gp has been reported for MRP1 ^{5, 9}. Interactions of PIs with P-gp and MRPs have been largely studied, but many questions remain. Studies of interactions with the recently discovered efflux protein, BCRP, are lacking. One study, on MDCKII-*Bcrp1* cells, indicated that murine *Bcrp1* was not a good transporter of PIs, but showed no data¹⁵. Gupta and

colleagues have demonstrated that ritonavir, saquinavir and nelfinavir are all human BCRP inhibitors, but not its substrates¹⁶. Moreover, Weiss and colleagues have shown significant inhibition of BCRP by many anti-HIV drugs, on MDCKII-Bcrp cells¹⁷.

It is currently recognized that the activity of P-gp is associated with its transport function. Modulation of this activity by a drug provides evidence for interaction of the drug with P-gp, possible transmembrane translocation and consequently the failure to cross the BBB and to be available at the site of action in the brain at appropriate concentrations.

In vitro, several studies have reported that atazanavir (ATV) was able to induce or to inhibit the expression and the functionality of P-gp, with different results according to the cell line and the concentration of ATV. An increase in P-gp expression as well P-gp function was reported in LS180 cells treated with 30 μ M ATV¹⁸. A decrease in P-gp activity was reported in human lymphocytes treated with ATV at concentrations above the therapeutic levels¹⁹ with also an inhibition of MRP efflux function²⁰.

However, no investigation of ATV as inducer or inhibitor of P-gp or other efflux pumps has been conducted at the human BBB level, either *in vitro* or *in vivo*. Moreover, no data on the transport of ATV across the human BBB have been described. These experiments regarding the modulation of P-gp and MRP expression and functionality need to be understood in order to evaluate the real involvement of ATV transport across the BBB.

According to the manufacturer (US package insert), the CNS penetration of atazanavir is minimal with cerebrospinal fluid (CSF) / plasma ratio of only 0.0021 to 0.0226. Despite the limited presence of ATV in the CSF compartment, the question about the presence of atazanavir in the brain parenchyma still remains. Drug distribution in the CSF reflects transport across the blood-CSF barrier, not drug transport across the BBB. The biological properties of BBB and the blood-CSF barrier (the choroid plexuses and arachnoid villi) are different.

The objective of the study was to compare the effect of ATV on expression and functionality of efflux pumps in normal lymphocytes and in human brain endothelial cells and to determine whether the interactions of ATV with efflux pumps may limit its transport through the BBB. In this view, we used the recently published and validated coculture model of human *in vitro* BBB able to predict passive and active transport of molecules into the CNS^{21, 22}.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals / Materials

ATV was a generous gift of Bristol-Myers Squibb (New York, New York, USA). Ficoll Histopaque®, dimethyl sulfoxide, cyclosporine A, probenecid and CD11b:FITC were from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). RPMI-1640 medium, fetal bovine serum (FBS), glutamine, human serum, penicillin-streptomycin-neomycin and phosphate buffer saline without CaCl_2 or MgCl_2 were from Gibco (Cergy

Pontoise, France). Endothelial cell medium was from Sciencell (San Diego, California, USA) CellFIX™, CytoFIX/CytoPERM™, PermWash Buffer™, R-PE-conjugated goat anti-mouse immunoglobulins were from Becton Dickinson (Le-Pont-De-Claix, France). UIC2:rPE antibody (specific for P-gp²³), CD4:FITC, CD8:PC5 and their respective isotype controls were from Beckman Coulter (Roissy, France), QCRL:rPE antibody (specific for MRP1²⁴) and IgG1 isotype control were from R&D Systems (Lille, France). Calcein-AM was from Interchim (Montluçon, France). MK571 was from Calbiochem (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). ¹⁴C-Sucrose was from Amersham (Buckingham-shire, UK). PSC833 was from Sanofi-Aventis (Paris, France). Ko-143 was from Schinkel (Nieuwegein, Netherlands). Transwell-Clear 1-cm² polyester membranes with 0.4 μ m pores were from Corning Costar (Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier, France). Mouse monoclonal anti-rabbit IgG antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA).

Subjects and cell treatment

Blood samples of healthy volunteers were obtained from the "Etablissement français du sang" (Rungis, France) and human PBMCs were isolated by density centrifugation in Histopaque-1077. PBMCs were used fresh and cultured at a density of 5×10^6 cells per well onto 24-well plates in RPMI-1640 medium supplemented by 10% FBS, 2 mM glutamine, 50 μ g/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin and 100 μ g/ml neomycin, at 37°C in a humid atmosphere with 5% CO₂.

Human fetal brain microvascular endothelial cells (HBMECs) were from Sciencell. Cells were seeded at 70 000 cells per well onto 6-well plates and at 14 000 cells per well onto 24-well plates. They were cultured in endothelial cell medium as recommended by the manufacturer, at 37°C in a humid atmosphere with 5% CO₂.

Cells (PBMCs and HBMECs) were treated either with vehicle control (DMSO 0.2%) or with 5 μ M ATV [ATV concentration did not exceed solubility maxima²⁵] and were incubated for 72 h (PBMCs) or for 20 h (HBMECs).

Effect of ATV on multidrug resistance transporter expression

Following incubation, expression of P-gp and MRP1 on lymphocytes and on HBMECs was determined by direct immunofluorescence.

For HBMECs, cells were washed and scraped. Then, all the cells (PBMCs and HBMECs) were centrifuged at 500 g for 5 min at 4°C, then fixed and permeabilized in CytoFIX/CytoPERM (1 ml, 20 min, 4°C). Following centrifugation (500 g, 5 min, 4°C), cells were resuspended in PermWash (1:10, 4°C, 1 ml for PBMCs or 500 μ l for HBMECs).

100 μ l of each suspension of cells were transferred into clean 5 ml tubes for incubation with different combinations of antibodies. P-gp expression was determined by incubation with 20 μ l of UIC2:rPE antibody or with the isotype control antibody IgG2a, for 1 h at 4 °C in the dark. MRP1 expression was

determined as above but with 10 µl of QCRL:rPE antibody and with the isotype control antibody IgG1, for 1 h at room temperature in the dark. Following antibody incubation, all samples were washed twice (1 ml PBS supplemented with 1% BSA, 4°C) followed by centrifugation (500 g, 5 min, 4°C) and analyzed by flow cytometry. Each experiment was performed on 9 different donors for PBMCs and on 6 different samples for HBMECs.

Effect of ATV on multidrug resistance transporter function

Following incubation, functionality of P-gp and MRP1 on lymphocytes and on HBMECs was assessed by measuring fluorescent dye efflux (calcein-AM), with or without specific inhibitors²⁶.

For PBMCs, cells were transferred into 1.5 ml tubes, washed with cold PBS, centrifuged (500 g, 5 min, 4°C) and resuspended with 1 ml RPMI-1640 medium. 100 µl of each suspension of cells were incubated with 0.1 µM calcein-AM for 30 min at 37°C in 1 ml RPMI medium with or without modulators (2 µM cyclosporine A or 30 µM MK571). Cyclosporine A at the concentration of 2 µM is a selective P-gp inhibitor²⁶, and MK571 is a selective MRP inhibitor²⁷. Cells were washed twice in cold PBS, then fixed with CellFIX (1:10, 400 µl, 4°C) and analyzed in a flow cytometer. Each experiment was performed on 10 different donors.

For HBMECs, cells were washed with cold PBS. One well per treatment (onto 24-well plates) was incubated with 0.1 µM calcein-AM alone, the second with calcein-AM + 2 µM cyclosporine A and the last with calcein-AM + 30 µM MK571, for 30 min at 37°C in 1 ml endothelial cell medium. Cells were washed twice in cold PBS, scraped, fixed with CellFIX (1:10, 400 µl, 4°C), then analyzed in a flow cytometer. Each experiment was performed three times in triplicate.

Flow cytometric analysis

Flow cytometry was conducted on a FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson). Forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) were detected on a linear scale dot plot and fluorescence was detected on a logarithmic scale histogram. Lymphocytes were electronically gated from the total PBMC population, using light scattering properties, collecting 10 000 events for each sample. The location of cell subpopulations (lymphocytes CD4, CD8 and monocytes) was verified by immunofluorescence assay using respectively CD4:FITC, CD8:PC5 and CD11b:FITC antibodies and their isotype control antibodies.

Data acquisition from the flow cytometric traces was performed using the computer software WINMDI version 2.9 (Scripps Research Institute, California, USA) to determine the geometric median FL1 or FL2 fluorescence analysis values.

Expression

Transporter expression in the electronically gated lymphocyte population was detected from a histogram measuring FL2 fluorescence. Since there is a direct relationship between the level of expression of the transporter and the shift in

fluorescence, transporter expression was shown as a mean increase in fluorescence (FL2). Results are expressed as normalized mean fluorescence intensity (MFI): $MFI = [\text{mean fluorescence intensity (Pgp or MRP1 stained sample)} - \text{mean fluorescence intensity (isotype control)}] / \text{mean fluorescence intensity (isotype control)}$.

Function

Fluorescence due to calcein was followed in channel 1 (FL1) in an electronically gated lymphocyte population and plotted as a histogram of FL1 staining. Transporter function was quantified as previously described²⁸ by use of the following equation:

$$\text{Percentage activity (\%)} = 100 - \frac{G_{\text{mean calcein}}}{G_{\text{mean inhibitor}}} \times 100$$

where $G_{\text{mean calcein}}$ is the geometric median fluorescence of calcein in tested samples and $G_{\text{mean inhibitor}}$ is the geometric median fluorescence of calcein in the presence of inhibitor (cyclosporine A or MK571).

In vitro human blood brain barrier model

The human autologous BBB model was a coculture of primary human brain endothelial cells (HBEC) and primary human astrocytes (HA) as previously described^{21, 22}. This *in vitro* model, previously validated, offers the possibility of subtle discrimination between degrees of BBB permeability and transport mechanisms. Cells were seeded at $5 \cdot 10^4$ cells per insert for HBEC and $2 \cdot 10^4$ cells per well for HA, onto 12-well Transwell plates. Cells were then grown on the plates for a minimum of 14 days and used for experimentation between days 14 and 21.

The presence of efflux transporters on HBEC was assessed by flow cytometry using specific antibodies for P-gp, MRP1 and BCRP (data not shown). The integrity of the BBB monolayer was confirmed by measuring the flux through the monolayer of the paracellular reference marker, [¹⁴C]-sucrose. Since proteins on the luminal HBEC membrane are distinct from proteins on the abluminal membrane, the polarity of human BBB active efflux transporters was demonstrated by measuring the efflux of the P-gp substrate, [³H]-digoxin.

[¹⁴C]-Sucrose transepithelial transport studies

For *in vitro* drug-transport study, the astrocytes were removed from the basal compartment and the media from both apical and basal compartments were replaced by transport buffer (TB) consisted of 150 mM NaCl, 5.2 mM KCl, 2.2 mM CaCl₂, 0.2 mM MgCl₂, 6 mM NaHCO₃, 2.8 mM glucose, and 5 mM HEPES (pH 7.4). Labeled sucrose (12.95 MBq.µmol⁻¹) was immediately introduced into the donor chamber (either the apical or the basal compartment). At various times after the addition of the compounds, aliquots were removed from the acceptor chamber (basal or apical compartments, respectively) for radioactivity counting. Experiments were done three times in triplicate.

³H]-Digoxin transepithelial transport studies

To validate the polarity of the human BBB model the efflux of P-gp substrate, [³H]-digoxin was tested. Transport efflux was determined from the apical to basal and from the basal to apical compartment, in order to measure the directional transport. The medium from the apical and basal compartments was replaced with transport buffer (TB). [³H]-digoxin (3.7×10^3 Bq per ml) was added to the apical compartment or to the basal compartment. At various time points after addition of the compound, 100 µl from the apical or basal compartment were removed and replaced with 100 µl of medium without marker compound. The ratio of permeability coefficients (basal to apical vs apical to basal compartment) was then calculated.

ATV transepithelial transport studies

Transepithelial transport was studied with cells grown on collagen-coated permeable support (Transwell-Clear 1-cm² polyester membranes with 0.4 µm pores). For transepithelial transport, BEC inserts were transferred into new 12-well plates. The culture medium for the apical compartment was removed by aspiration. Transport buffer (TB) containing 20 µM Ko-143 (as a BCRP selective inhibitor²⁹), 20 µM PSC833 (P-gp inhibitor³⁰) and 20 µM probenecid (as a selective inhibitor of organic anion transporters and MRPs²⁵) was added to the apical and basolateral compartments. The monolayers were kept for 30 minutes at 37°C in 5% CO₂ and were continuously agitated. 50 µM ATV was then added to the apical or baso-lateral compartment. The monolayers were kept for 1 hour at 37°C in 5% CO₂ and were continuously agitated during the transport experiments. 100 µl from each compartment were then taken for ATV quantification. Experiments were done twice in triplicate.

ATV quantification

ATV concentration was determined by a competitive enzyme immunoassay as previously described³¹.

Standard immunoassay procedure

Assays were performed in 96-well microtitration plates coated with mouse monoclonal anti-rabbit IgG antibodies. After 24 h of immunoreaction at 4°C, the plates were washed and 200 µl of Ellman's reagent were added to each well. After 2 h of gentle shaking in the dark at room temperature, the absorbance at 410 nm (reference filter at 570 nm) was measured in each well. Results were

expressed as $B/B_0 \times 100$ as a function of the concentration (logarithmic scale), where B and B₀ represent the bound enzymatic activity in the presence or absence of competitor, respectively. A linear log-logit transformation was used to fit the calibration curve. All measurements for standards (78.125, 156.25, 312.5, 625, 1250, 2500, 5000 and 10000 pg/ml) and samples were done in duplicate, and quadruplicate for B₀ values.

Preparation of biological sample

100 µL samples were taken from the apical or basolateral chamber. Sample were extracted with 400 µL of methanol (1/4; vol/vol), vortexed for 20 min and then centrifuged at 12 000 g for 10 min. The supernatant phase was dried under vacuum using a Speed Vac apparatus (Savant, Farmingdale, NY). The dry residue was dissolved in 1 ml of EIA buffer, containing 5% methanol to ensure good solubilization of lipophilic drugs, for 1 h and assayed for ATV content.

Statistics

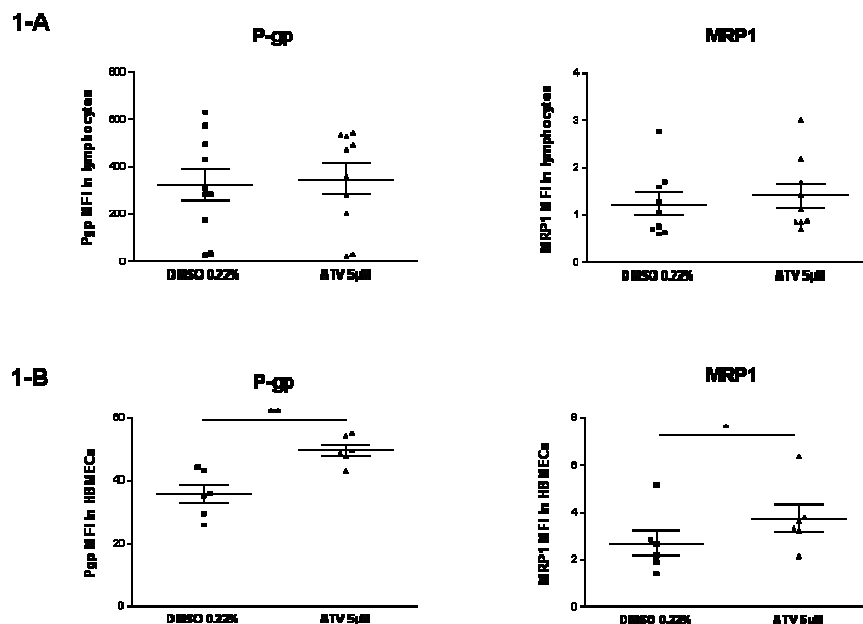
Data are expressed as the mean ± SEM. GraphPad Prism® 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used for normality assessment (Shapiro-Wilk test), comparison between means (two-tailed Student's t-test - transporter expression and activity studies) and variance analysis (one-way ANOVA - ATV transport study). Statistical significance of differences between group means was assessed by the Dunnett's post-test (B to A transport as control group). Differences between means were considered to be significant when the P-value was less than 0.05.

RESULTS**Effect of ATV on efflux transporter expression**

Following incubation with 5 µM ATV, P-gp and MRP1 expression was investigated by direct immunofluorescence.

In PBMCs, when compared with vehicle control (0.2% DMSO), cell treatment with 5 µM ATV did not significantly change (N=9) P-gp or MRP1 expression in total lymphocytes *in vitro* (fig. 1-A).

In HBMECs, when compared with vehicle control (0.2% DMSO), 5 µM ATV caused a significant increase of $44.5 \pm 14.0\%$ in P-gp expression ($p=0.0092$, N=6), and a significant increase of $52.7 \pm 26.1\%$ in MRP1 expression ($p=0.0298$, N=6) (fig. 1-B).


Figure 1

Expression of P-gp and MRP1 in cells treated by 5 μ M atazanavir (ATV). Data are expressed as mean increase of fluorescence (MFI) of P-gp or MRP1 expression, normalized by their respective isotype control. Statistical comparisons were made using two-tailed Student's *t* tests (**P* < 0.05 and ***P* < 0.01).

(A) in lymphocytes following 72-h incubation

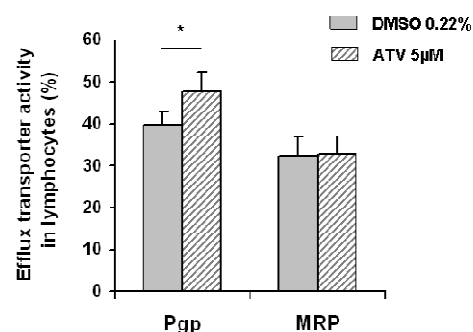
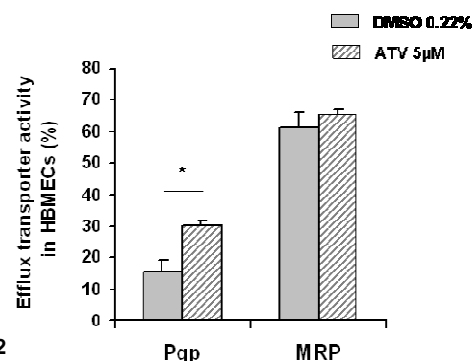
(B) in human fetal brain microvascular endothelial cells (HBMECs) following 20-h incubation

Effect of ATV on efflux transporter function

Following incubation with 5 μ M ATV, the percentage of MRP and P-gp activity was measured as described above by the effect of selective inhibitor on calcein-AM accumulation.

In PBMCs, the percentage inhibition caused by 2 μ M cyclosporine A was $39.61 \pm 8.30\%$ in the DMSO control and $47.60 \pm 10.25\%$ in ATV-treated cells. The increase in P-gp activity was statistically significant (*p*=0.02, *N*=10). 30 μ M MK 571 caused no statistically significant change in calcein-AM accumulation in ATV-treated cells (*N*=10) (fig. 2-A).

In HBMECs, the percentage inhibition caused by 2 μ M cyclosporine A was $15.32 \pm 3.80\%$ in the DMSO control and $30.20 \pm 1.30\%$ in ATV-treated cells. The increase in P-gp activity was statistically significant (*p*=0.046, *N*=3). 30 μ M MK 571 caused no statistically significant change in calcein-AM accumulation in ATV-treated cells (*N*=3) (fig. 2-B).

2-A

2-B

Figure 2

Functionality of P-gp and MRPs in cells treated by 5 μ M atazanavir (ATV). Data are expressed as percentage of P-gp or MRPs activity, measured by the effect of 2 μ M cyclosporine A or 30 μ M MK571 respectively, on calcein-AM accumulation. Statistical comparisons were made using two-tailed Student's *t* tests (**P* < 0.05).

(A) in lymphocytes following 72-h incubation

(B) in human fetal brain microvascular endothelial cells (HBMECs) following 20-h incubation

In vitro human BBB atazanavir transport study

Before the *in vitro* human BBB model was used to measure the BBB passage of ATV, the tightness of the brain endothelial monolayer was checked by assessing the permeability to [14 C]-sucrose.

The *in vitro* model shows that sucrose penetration in the brain parenchyma compartment was minimal ($Pe = 2.17 \pm 0.25 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$; $P < 0.05$) owing to very restrictive transport at the BBB (Fig. 3-A). This integrity was associated with the expression between neighboring endothelial cells of claudin-5, a junctional protein, which regulate paracellular permeability²¹. The experimental *in vitro* coculture-based model of human BBB shows functional active efflux transporters. P-gp, MRP1 and BCRP have been demonstrated at the level of the *in vitro* coculture-based model of human BBB (data not shown). Passage of P-gp substrate [3 H]-digoxin in this model was poor. The permeability coefficient (Pe) of *in vitro* digoxin transport from the basal to apical compartment was higher than Pe of apical to basal transport ($5.67 \pm 0.98 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ vs $0.33 \pm 0.13 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$; mean of three independent experiments in triplicate). Pretreatment of the coculture model of human BBB with 20 μM PSC833 decreased digoxin transport from the brain parenchyma compartment to the blood compartment by about 32.5% ($P < 0.05$).

The permeability of ATV was then measured between apical and basal compartments both ways. Fig. 3-B shows the transport of atazanavir at the human BBB. Basal-to-apical transport was 5-fold higher than the apical-to-basal transport ($10.02 \pm 0.68 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ vs $2.06 \pm 0.41 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$), suggesting a very low permeability of brain endothelial monolayer to atazanavir. Pretreatment of cells with Ko-143, PSC833 or probenecid at a concentration of 20 μM significantly decreased the basal-to-apical transport ($p = 0.0003$). Permeability coefficients (Pe) of ATV transport from the basal to apical compartment were $3.99 \pm 0.66 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ with Ko-143, $3.35 \pm 0.05 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ with PSC833, and $3.98 \pm 0.08 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ with probenecid.

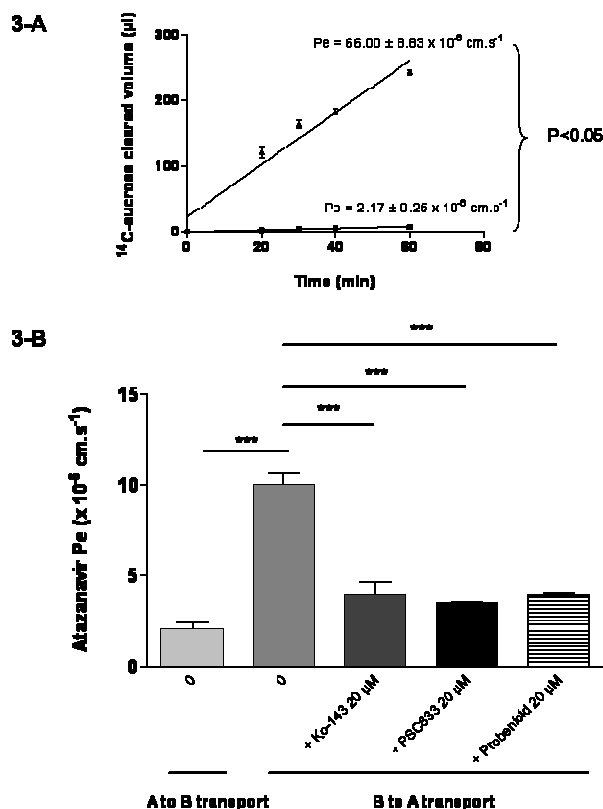


Figure 3

(A) Checking integrity of the *in vitro* human BBB model. Flux of [14 C]-sucrose across the filter without cells (triangle), and across the filter covered by a monolayer of human brain endothelial cells in coculture with human primary astrocytes (squares). Each point represents the mean \pm S.E.M. of three independent experiments. Three filters were used in each experimental condition. Statistical analysis was made using two-tailed Student's *t* tests with $P < 0.05$ as the limit of significance.

(B) Permeability of the *in vitro* human BBB model to 50 μM atazanavir (ATV). Data are expressed as atazanavir permeability coefficients (Pe) across the human BBB model in the absence (apical to basal or basal to apical) or in presence of specific inhibitors (Ko-143, PSC833 or probenecid, 20 μM each). Each point is the mean \pm S.E.M. for three different filters, and the data are the mean of two independent experiments. Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA with a Dunett's post-test, $P < 0.05$ is the limit of significance (** $P < 0.001$).

DISCUSSION

Efflux transporters limit the accumulation of antiretrovirals in the cells and in the brain compartment: the present work reports the potential of the anti-retroviral drug atazanavir to modulate P-gp and MRP expression and function, either on total lymphocytes or on human fetal brain microvascular endothelial cells, and to cross the human BBB. Modulation of efflux transporter activity by a drug suggests its interaction with these transporters and possible transmembrane translocation. These mechanisms might explain the failure for the drug to cross the BBB and to accumulate at an appropriate concentration at the site of action in the brain.

Atazanavir CSF penetration is demonstrated but the question of transport of this compound at the level of human BBB remains. Drug distribution in the CSF reflects transport across the blood-CSF barrier, not drug transport across the BBB. In rats, quantitative whole-body autoradiography analysis following administration of DCP 681, a potent and selective inhibitor of HIV-1, with or without ritonavir showed very low levels of DCP 681 in the brain and higher concentrations in the CSF. Combination with ritonavir did not significantly modify concentrations in the brain, although CSF concentration increased 4-fold³². Moreover, in guinea-pigs, Anthonypillai and colleagues have demonstrated the ability of [³H]-tenofovir to cross the blood-CSF barrier, but not the blood-brain barrier³³. All these results indicate that CSF data alone should be interpreted with caution and cannot be used alone as a surrogate for CNS penetration.

Major findings of this study are: (1) ATV (5 μ M) does not modulate P-gp and MRP1 expression, in total lymphocytes; (2) ATV (5 μ M) increases P-gp and MRP1 expression in HBMECs; (3) in contrast to MRPs, ATV (5 μ M) increases P-gp function in total lymphocytes and HBMECs; (4) the efflux transporters P-gp, MRPs and BCRP play a major role in preventing the passage of ATV across the human BBB and thus its entry into the CNS.

Inducing effects of ATV on P-gp and MRP expression have been reported in some but not all *in vitro* studies. We found no increase in P-gp/MRP1 expression in human lymphocytes for individual donors (N=10) treated with ATV (Fig. 1-A). Although there was no effect of ATV on P-gp/MRP1 expression in this study, there was overall change in P-gp but not MRP1 function, increasing intracellular accumulation of calcein-AM with cyclosporine A after exposure of human lymphocytes (N=10 donors) to 5 μ M ATV for 3 days (Fig. 2-A).

Atazanavir inhibition of P-gp and MRP has been reported^{20, 25}, based on a direct inhibition of efflux transporter substrate (rhodamine 123, carboxyfluorescein) accumulation by ATV. Complementary to those results, the present study mainly addresses the functionality of efflux transporters. Cells were incubated for 72 h with ATV, then washed and tested for functionality. Perloff and colleagues have shown that extended exposure of LS180V cells to ATV (3-30 μ M) increased P-gp functionality¹⁸. We present evidence of an interaction of atazanavir with the efflux transporter P-gp. Peak plasma concentrations of atazanavir are usually in the range of 2.9 to 5.9 μ g/ml (around 4-8 μ M)^{34,35}. Considering these *in vivo* ATV concentrations, the *in vitro* data suggest a potential for ATV to cause drug interactions at the level of P-gp-mediated drug transport.

Moreover, there was considerable inter-individual variability in P-gp and MRP activity after ATV treatment, possibly due to polymorphism of human genes which encode specifically for P-gp and MRP efflux transporters.

In HBMECs we showed an increase in P-gp and MRP1 expression, and an increase in P-gp but not MRP function. Cell response to ATV possibly depends on the expression level of transporters and pregnane X receptor, between physiological barriers and peripheral cells. The variability between cell types in response to ATV might be caused by genetic variation, either in the *mdr1* (encoding P-gp) or *mrp1* genes, their regulatory partners, or in the other genes involved in ATV disposition (other ABC transporters, metabolizing enzymes or medium binding proteins). The pregnane X receptor (PXR in rodents, SXR in humans) regulates P-glycoprotein expression. It is expressed in endothelial cells³⁶ and PBMCs³⁷. Up-regulation of P-gp/MRP1 expression and P-gp function at the level of brain endothelial cells possibly participates in reducing the efficacy of ATV in brain.

To further demonstrate that this interaction could influence penetration of ATV from the blood circulation into the brain, we employed an *in vitro* human BBB model, previously described²¹. The coculture human BBB model used here consists of primary cultures of human brain capillary endothelial cells cocultivated with primary cultures of human astrocytes. The advantage of this system is that it is made of primary culture cells; it avoids species, age and inter-individual differences because the two cell types are obtained from the same donor. This model has been shown to express functional efflux transporters such as P-gp, MRP1 and BCRP (data not shown)²². Furthermore, the *in vitro* model shows that sucrose penetration in the brain parenchyma compartment (basal compartment) was minimal owing to very restrictive transport at the BBB (Fig. 3-A). This integrity was associated with the expression between neighboring endothelial cells of claudin-5²¹, a junctional protein which regulates paracellular endothelial permeability.

Limited apical to basal transport of ATV across the *in vitro* coculture model of the human BBB was observed, despite the highly lipophilic nature of this compound. Flux of ATV in the basal to apical direction was higher (9-fold). This may be due to active transport by P-gp or other efflux transporters at the level of human BBB.

In the presence of PSC833 (valsopodar), a P-gp inhibitor, a significant decrease in ATV BBB transport efflux was observed from the basolateral to apical compartment. This suggests that the P-gp transporter is involved in ATV transport (Fig 3-B). However, most P-gp inhibitors also inhibit other efflux proteins: PSC833 at the concentration of 20 μ M also inhibits MRP1 and MRP2. Pretreatment of cells with probenecid (a non-selective inhibitor of organic anion transporters and MRPs), as well as with KO143 (a selective inhibitor of BCRP) at a concentration of 20 μ M significantly decreased the efflux clearance of atazanavir. Although the inhibitors used to investigate ATV as substrate of P-gp and MRPs are less specific, our findings suggest a broad overlapping ATV substrate specificity of efflux pumps (P-gp, MRPs and BCRP) which plays a pivotal role in the low permeability of the brain to

ATV, limiting the efficacy of this anti-HIV-1 agent within the cell layers and in the CNS.

In summary, the findings from the present study indicate that atazanavir exposure up-regulates P-gp and MRP1 expression in human brain microvascular endothelial cells, and up-regulates P-gp function in lymphocytes and HBMECs. These data suggest different mechanisms of transporter regulation (P-gp and MRPs), in circulating T CD4+ cells and in brain endothelial cells. We report for the first time that, in addition to the interaction with P-gp, ATV interacts with MRPs and BCRP at the BBB level; this interaction limits its entry into brain parenchyma.

Acknowledgments: We would like to thank the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA for financial support. We would also like to thank Jean-François Heilier (Université Catholique de Louvain, Belgium) for his advice in statistics.

REFERENCES

- Eisenblatter T, Huwel S, Galla HJ. Characterisation of the brain multidrug resistance protein (BMDP/ABCG2/BCRP) expressed at the blood-brain barrier. *Brain Res* 2003; 971(2):221-231.
- Lipton SA, Gendelman HE. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Dementia associated with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1995; 332(14):934-940.
- Choo EF, Leake B, Wandel C et al. Pharmacological inhibition of P-glycoprotein transport enhances the distribution of HIV-1 protease inhibitors into brain and testes. *Drug Metab Dispos* 2000; 28(6):655-660.
- Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D et al. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(2):695-698.
- Huisman MT, Smit JW, Wiltshire HR et al. P-glycoprotein limits oral availability, brain, and fetal penetration of saquinavir even with high doses of ritonavir. *Mol Pharmacol* 2001; 59(4):806-813.
- Kim RB, Fromm MF, Wandel C et al. The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors. *J Clin Invest* 1998; 101(2):289-294.
- Black PH. HTLV-III, AIDS, and the brain. *N Engl J Med* 1985; 313(24):1538-1540.
- Litman T, Druley TE, Stein WD, Bates SE. From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58(7):931-959.
- Seelig A, Blatter XL, Wohnsland F. Substrate recognition by P-glycoprotein and the multidrug resistance-associated protein MRP1: a comparison. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2000; 38(3):111-121.
- Perloff MD, Von Moltke LL, Marchand JE, Greenblatt DJ. Ritonavir induces P-glycoprotein expression, multidrug resistance-associated protein (MRP1) expression, and drug transporter-mediated activity in a human intestinal cell line. *J Pharm Sci* 2001; 90(11):1829-1837.
- Vishnuvardhan D, Moltke LL, Richert C, Greenblatt DJ. Lopinavir: acute exposure inhibits P-glycoprotein; extended exposure induces P-glycoprotein. *AIDS* 2003; 17(7):1092-1094.
- Perloff MD, Von Moltke LL, Fahey JM, Greenblatt DJ. Induction of P-glycoprotein expression and activity by ritonavir in bovine brain microvessel endothelial cells. *J Pharm Pharmacol* 2007; 59(7):947-953.
- Chandler B, Almond L, Ford J et al. The effects of protease inhibitors and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors on p-glycoprotein expression in peripheral blood mononuclear cells in vitro. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; 33(5):551-556.
- Ford J, Meaden ER, Hoggard PG et al. Effect of protease inhibitor-containing regimens on lymphocyte multidrug resistance transporter expression. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52(3):354-358.
- Huisman MT, Smit JW, Crommentuyn KM et al. Multidrug resistance protein 2 (MRP2) transports HIV protease inhibitors, and transport can be enhanced by other drugs. *AIDS* 2002; 16(17):2295-2301.
- Gupta A, Zhang Y, Unadkat JD, Mao Q. HIV protease inhibitors are inhibitors but not substrates of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 310(1):334-341.
- Weiss J, Rose J, Storch CH et al. Modulation of human BCRP (ABCG2) activity by anti-HIV drugs. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59(2):238-245.
- Perloff ES, Duan SX, Skolnik PR, Greenblatt DJ, Von Moltke LL. Atazanavir: effects on P-glycoprotein transport and CYP3A metabolism in vitro. *Drug Metab Dispos* 2005; 33(6):764-770.
- Chinn LW, Gow JM, Tse MM, Becker SL, Kroetz DL. Interindividual variability in the effect of atazanavir and saquinavir on the expression of lymphocyte P-glycoprotein. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60(1):61-67.
- Lucia MB, Golotta C, Rutella S et al. Atazanavir inhibits P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein efflux activity. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 39(5):635-637.
- Josserand V, Pelerin H, Bruin B et al. Evaluation of drug penetration into the brain: a double study by in vivo imaging with positron emission tomography and using an in vitro model of the human blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316(1):79-86.
- Megard I, Garrigues A, Orlowski S et al. A co-culture-based model of human blood-brain barrier: application to active transport of indinavir and in vivo-in vitro correlation. *Brain Res* 2002; 927(2):153-167.
- Meaden ER, Hoggard PG, Khoo SH, Back DJ. Determination of P-gp and MRP1 expression and function in peripheral blood mononuclear cells in vivo. *J Immunol Methods* 2002; 262(1-2):159-165.
- Fernetti C, Pascolo L, Podda E et al. Preparation of an antibody recognizing both human and rodent MRP1. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288(4):1064-1068.
- Storch CH, Theile D, Lindenmaier H, Haefeli WE, Weiss J. Comparison of the inhibitory activity of anti-HIV drugs on P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol* 2007; 73(10):1573-1581.

26. Legrand O, Simonin G, Perrot JY, Zittoun R, Marie JP. Pgp and MRP activities using calcein-AM are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia patients. *Blood* 1998; 91(12):4480-4488.
27. Gekeler V, Ise W, Sanders KH, Ulrich WR, Beck J. The leukotriene LTD4 receptor antagonist MK571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 208(1):345-352.
28. Rautio J, Humphreys JE, Webster LO et al. In vitro p-glycoprotein inhibition assays for assessment of clinical drug interaction potential of new drug candidates: a recommendation for probe substrates. *Drug Metab Dispos* 2006; 34(5):786-792.
29. Allen JD, van LA, Lakhai JM et al. Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. *Mol Cancer Ther* 2002; 1(6):417-425.
30. Sadanand V, Kankesan J, Yusuf A et al. Effect of PSC 833, a potent inhibitor of P-glycoprotein, on the growth of astrocytoma cells in vitro. *Cancer Lett* 2003; 198(1):21-27.
31. Roucairol C, Azoulay S, Nevers MC et al. Quantitative immunoassay to measure plasma and intracellular atazanavir levels: analysis of drug accumulation in cultured T cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(2):405-411.
32. Solon EG, Balani SK, Luo G et al. Interaction of ritonavir on tissue distribution of a [(14)c]L-valinamide, a potent human immunodeficiency virus-1 protease inhibitor, in rats using quantitative whole-body autoradiography. *Drug Metab Dispos* 2002; 30(11):1164-1169.
33. Anthonypillai C, Gibbs JE, Thomas SA. The distribution of the anti-HIV drug, tenofovir (PMPA), into the brain, CSF and choroid plexuses. *Cerebrospinal Fluid Res* 2006; 3:1.
34. Goldsmith DR, Perry CM. Atazanavir. *Drugs* 2003; 63(16):1679-1693.
35. Taburet AM, Piketty C, Chazallon C et al. Interactions between atazanavir-ritonavir and tenofovir in heavily pretreated human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(6):2091-2096.
36. Bauer B, Hartz AM, Fricker G, Miller DS. Pregnane X receptor up-regulation of P-glycoprotein expression and transport function at the blood-brain barrier. *Mol Pharmacol* 2004; 66(3):413-419.
37. Siest G, Jeannesson E, Marteau JB et al. Transcription factors and drug metabolizing enzymes genes expression in lymphocytes from human healthy subjects. *Drug Metab Dispos* 2007.

2- Résultats complémentaires sur l'expression en ARNm des transporteurs ABC

Afin de pouvoir comparer l'expression en ARNm des transporteurs ABC présents dans nos différents modèles cellulaires, nous avons réalisé une expérience de RT-PCR semi-quantitative (normalisation par rapport au gène HPRT).

Les CMSPs expriment la Pgp, le MRP1, la MRP5 et la MRP6.

Les cellules endothéliales cérébrales humaines fœtales et les capillaires endothéliaux humains adultes ont des niveaux d'expression des transporteurs assez similaires, mis à part pour la Pgp où le niveau d'expression semble plus faible chez l'adulte.

En ce qui concerne la Pgp, les niveaux d'expression semblent du même ordre de grandeur pour les CMSPs et les cellules endothéliales cérébrales fœtales. Pour les MRP1, MRP5 et MRP6, les niveaux d'expression semblent plus élevés dans les CMSPs. Quant à la MRP2, la MRP4 et la BCRP, elles sont indétectables dans nos conditions expérimentales dans les CMSPs et présentes dans les cellules endothéliales fœtales ou adultes.

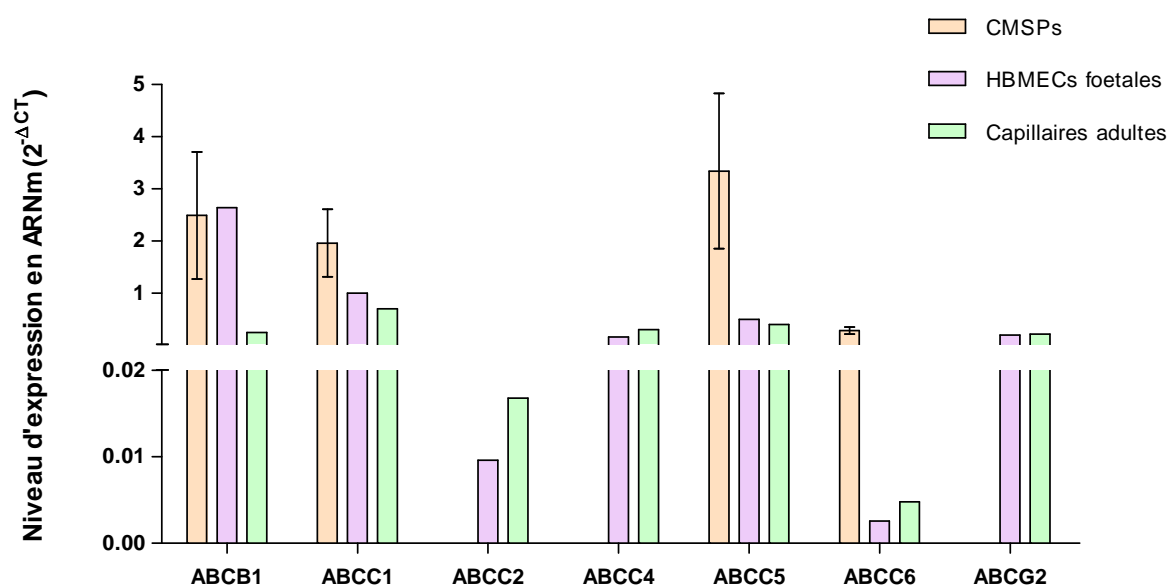


Figure 50 : Etude de l'expression des transporteurs d'efflux dans les CMSPs (en orange), les cellules endothéliales cérébrales humaines fœtales (en rose), les capillaires endothéliaux humains adultes (en vert), par RT-PCR en temps réel

ABCB1 : gène codant pour la Pgp

ABCC1-6 : gène codant pour les MRPs 1 à 6

ABCG2 : gène codant pour la BCRP

3- Discussion

Le travail présenté dans ce chapitre rapporte la capacité de l'atazanavir, un inhibiteur de la protéase utilisé dans le traitement des patients infectés par le VIH, à réguler l'expression et la fonctionnalité de la Pgp et des MRPs, à la fois sur les lymphocytes et sur les cellules endothéliales cérébrales humaines. Il présente également la capacité de ce médicament à traverser la barrière hémato-encéphalique.

Cette étude a démontré qu'il n'y avait pas d'augmentation de l'expression de la Pgp et de la MRP1 dans les lymphocytes traités avec 5 μ M d'ATV pendant 72 h (N=10). Bien qu'il n'ait aucun effet sur l'expression, l'ATV augmente la fonctionnalité de la Pgp, mais pas de la MRP1 dans les mêmes cellules.

De précédentes études ont montré que l'ATV pouvait interagir avec la Pgp et les MRPs, par inhibition directe de l'efflux d'un substrat spécifique (Rhodamine 123, carboxyfluorescéine) (Lucia *et al.*, 2005 ; Storch *et al.*, 2007). L'étude présentée ici, est complémentaire, elle renseigne sur la fonctionnalité des transporteurs après 72 ou 24 h de traitement. Perloff et ses collaborateurs ont démontré qu'un traitement prolongé des cellules LS180V avec de l'ATV (3-30 μ M) peut augmenter la fonctionnalité de la Pgp.

Dans les cellules endothéliales cérébrales, nous avons montré à la fois une augmentation de l'expression de la Pgp et de la MRP1, et une augmentation de la fonctionnalité de la Pgp mais pas de des MRPs.

Les résultats sur l'expression des transporteurs au niveau de la BHE et au niveau de la circulation systémique sont donc différents. Différents modes de régulation des transporteurs pourraient intervenir à ces deux niveaux. La réponse cellulaire à l'ATV dépend peut-être du niveau d'expression des facteurs de transcription, tels que les récepteurs nucléaires « pregnane X receptor », qui peut être différent entre les barrières physiologiques et les cellules périphériques. La variabilité entre les types cellulaires peut être causée par des variations génétiques, à la fois sur le gène *mdr1* (codant pour la Pgp), sur leur partenaires régulateurs, ou bien sur d'autres gènes impliqués dans la biodistribution de l'ATV (autres transporteurs ABC ou SLC, enzymes du métabolisme, protéine du milieu...).

Nous n'avons remarqué aucune différence dans l'expression du gène *mdr1* au niveau des CMSPs et des cellules endothéliales cérébrales fœtales. Cependant la régulation de ce gène pourrait être différente en réponse au traitement dans les deux types cellulaires. Le récepteur nucléaire type PXR (PXR chez les rongeurs, SXR chez l'homme) est connu pour réguler l'expression de la Pgp (Rosenfeld *et al.*, 2003). Il est exprimé dans les cellules endothéliales (Bauer *et al.*, 2004) et dans les cellules mononucléées du sang périphérique (Siest *et al.*, 2008 ; Albermann *et al.*, 2005). Aucune donnée n'existe sur la différence d'expression du gène codant pour PXR entre les CMSPs et la BHE, mais par

exemple dans le foie, le gène *pxr* est deux fois plus exprimé que dans les CMSPs (Albermann *et al.*, 2005).

L'induction de l'expression de la Pgp et de la MRP1, ainsi que de la fonctionnalité de la Pgp, au niveau des cellules endothéliales cérébrales pourrait participer à réduire l'efficacité de l'ATV dans le cerveau.

Afin de démontrer plus précisément que cette interaction peut influencer le passage de l'ATV de la circulation sanguine vers le SNC, nous avons utilisé un modèle *in vitro* de BHE humaine disponible au laboratoire. Ce modèle consiste en l'utilisation de co-cultures primaires de cellules endothéliales de capillaires cérébraux humains adultes, avec des cellules gliales provenant du même donneur. L'avantage de ce système est de s'affranchir des différences inter-espèces, inter-âges, et interindividuelles.

Un passage limité de l'ATV à travers le modèle de BHE (du compartiment apical, représentant le sang, vers le compartiment basal, représentant le SNC) est observé, en dépit de la nature hautement lipophile de la molécule. En effet, le flux d'ATV de B vers A est neuf fois plus élevé que celui de A vers B. Ce faible passage peut être dû au transport actif de l'ATV par la Pgp ou d'autres protéines d'efflux présents au niveau de la BHE.

En présence de PSC833 [valsopodar, un inhibiteur de la Pgp (Sadanand *et al.*, 2003)], une diminution du transport de B vers A, de l'ATV, est observée. Ceci suggère que la Pgp est impliquée dans le transport de l'ATV. Cependant, beaucoup d'inhibiteurs de la Pgp inhibent également d'autres protéines d'efflux : le PSC833 à la concentration de 20 μ M inhibe également les MRP1 et 2. Un prétraitement des cellules avec du probénécide [un inhibiteur des transporteurs d'anions organiques et des MRPs (Storch *et al.*, 2007)] ou de KO-143 [un inhibiteur de la BCRP (Allen *et al.*, 2002)] à la concentration de 20 μ M, diminue la clairance de l'ATV. Bien que les inhibiteurs utilisés ne soient pas toujours spécifiques d'un seul transporteur, nos résultats suggèrent un recouvrement des propriétés de substrat de l'ATV vis-à-vis des transporteurs d'efflux (Pgp, MRPs, BCRP). Ces transporteurs pourraient jouer un rôle clé dans le passage de l'ATV dans le SNC, limitant son efficacité dans ce compartiment.

Les résultats de cette étude indiquent qu'un traitement avec de l'ATV induit l'expression de la Pgp et de la MRP1 dans les cellules endothéliales cérébrales, et augmente la fonctionnalité de la Pgp dans les lymphocytes et les cellules endothéliales cérébrales. Ces données suggèrent que différents mécanismes de régulation des transporteurs d'efflux pourraient être impliqués au niveau central (dans les cellules endothéliales cérébrales) et au niveau périphérique (dans les lymphocytes circulants). Il est montré, ici,

qu'en plus de son interaction avec la Pgp, l'ATV interagirait avec les MRPs et la BCRP au niveau de la BHE humaine, limitant ainsi son entrée dans le parenchyme cérébral.

DISCUSSION GENERALE

-

L'objectif de ce travail, portant sur l'étude comparative *in vitro* des multi-thérapies anti-VIH, a été de fournir des arguments sur l'intérêt de prendre en compte les transporteurs ABC dans les études pharmacologiques des antirétroviraux. De nombreuses études laissent en effet penser que la Pgp, les MRPs, la BCRP sont à la fois des acteurs et des cibles thérapeutiques, pouvant limiter ou améliorer l'efficacité des multi-thérapies antirétrovirales. Cependant, ces transporteurs sont loin d'être les seuls à participer à l'échappement thérapeutique touchant les patients infectés par le VIH et leur implication reste controversée.

Le succès thérapeutique dépend en grande partie d'une bonne convergence entre trois facteurs : la maîtrise de la charge virale, la bonne adhésion du patient au traitement et une pharmacologie adéquate (Bartlett *et al.*, 2001). Le suivi thérapeutique pharmacologique est donc l'une des conditions essentielles d'une prise en charge thérapeutique satisfaisante (Aarnoutse *et al.*, 2003 ; Clevenbergh *et al.*, 2004). Les procédures mises en place à ce jour, se concentrent sur le dosage des concentrations plasmatiques. Cependant, la cellule étant le siège de la réplication virale, seules pourraient être pertinentes les mesures des concentrations intracellulaires, d'autant que de nombreux travaux ont montré l'absence de corrélations entre les concentrations plasmatiques des antirétroviraux et leurs concentrations intracellulaires (Akeb *et al.*, 2002 ; Azoulay *et al.*, 2004-a ; Azoulay *et al.*, 2004-b ; Almond *et al.*, 2005).

Ainsi, les transporteurs d'efflux de xénobiotiques, tels que la Pgp, les MRPs, la BCRP, pouvant résulter en de faibles concentrations intracellulaires, peuvent être des variables biologiques pertinentes à prendre en compte dans les études pharmacologiques. L'efficacité d'une combinaison thérapeutique dépend du niveau d'activation des cellules cibles et des interactions médicamenteuses qui pourraient limiter leur accès à ce niveau. La compréhension des régulations génique et fonctionnelle des transporteurs d'efflux dans le cadre de multi-thérapies antirétrovirales pourrait aider à une optimisation de la biodisponibilité cellulaire et/ou tissulaire des ARV.

Dans ce contexte, ce travail de thèse s'est articulé autour de trois axes majeurs que nous allons discuter par la suite :

1. Définir le caractère substrat et/ou inhibiteur de molécules clés des thérapies antirétrovirales actuelles : l'emtricitabine (FTC), le ténofovir (TFV), l'efavirenz (EFV) et l'atazanavir (ATV), vis-à-vis des transporteurs Pgp, MRPs et BCRP
2. Etudier l'impact des multi-thérapies anti-VIH sur l'expression et la fonctionnalité de ces transporteurs
3. Définir l'impact de cette régulation sur l'accumulation intracellulaire des médicaments associés

Choix des modèles cellulaires et des conditions expérimentales

Nous avons recherché des réponses à ces interrogations en nous plaçant dans des conditions expérimentales *in vitro* les plus proches possibles des conditions physiologiques. Tout d'abord, nous avons choisi des modèles cellulaires proches de ceux présents *in vivo* :

- les cellules mononucléées du sang périphérique issu de donneurs sains. Ces cellules ne sont pas activées, ce qui est le cas chez des patients dont la charge virale est contrôlée
- un modèle de barrière hémato-encéphalique constitué de cultures primaires de cellules endothéliales cérébrales et de cellules gliales, toutes deux d'origine humaine.

Ces deux modèles ont déjà montré leur pertinence dans de nombreuses études (Meaden *et al.*, 2002 ; Megard *et al.*, 2002 ; Josserand *et al.*, 2006 ; Roucairol *et al.*, 2007). Leur utilisation est également appropriée dans l'étude du VIH, les CMSPs étant les cellules cibles du VIH, et la BHE participant, de par ses propriétés, à l'installation d'une infection latente et persistante dans le SNC.

Nous avons également utilisé des concentrations d'antirétroviraux proches des concentrations plasmatiques retrouvées chez les patients. Pour l'atazanavir, les concentrations plasmatiques maximales sont généralement de l'ordre de 2,9 à 5,9 µg/ml, ce qui correspond à 4-8 µM (Goldsmith et Perry, 2003 ; Taburet *et al.*, 2003). Pour le lopinavir, elles sont de 3 à 8 µg/ml (4,8 à 12,7 µM) (Azoulay *et al.*, 2005). Pour l'emtricitabine, elles sont autour de 1,8 µg/ml (7,2 µM) [Emtriva (emtricitabine) Product Information, Gilead Sciences, Inc., 2003] (Molina *et al.*, 2004). Pour l'efavirenz, elles sont d'environ 2,5 µg/ml (7,9 µM) (Molina *et al.*, 2004). Pour le tenofovir, elles sont d'environ 296 ng/ml et d'environ 326 ng/ml lorsqu'il est pris lors d'un repas, soit environ 1 µM [Viread (Tenofovir disoproxyl fumarate) Product Information, Gilead Sciences]. Lors de nos expériences, nous avons généralement utilisé des concentrations de 5 µM, ce qui correspond en moyenne aux concentrations maximales observées chez les patients, mis à part pour le ténofovir, pour lequel nous avons légèrement surestimé la concentration.

Nous avons également utilisé pour nos expériences des milieux supplémentés avec du sérum de veau fœtal (SVF). La concentration en albumine dans le sérum est de 40 mg/ml (0,6 mM) (Quinlan *et al.*, 2005). 10% de SVF contiennent donc 60 µM d'albumine, ce qui est largement supérieur à nos concentrations d'antirétroviraux et donc suffisant pour palier aux différences dues aux liaisons protéiques, notamment pour les IPs et l'EFV.

Caractère substrat et/ou inhibiteur des ARV vis-à-vis des transporteurs Pgp, MRPs et BCRP

La Pgp, les MRPs, la BCRP, appartenant à la famille des transporteurs ABC (Higgins, 1992 ; Klein *et al.*, 1999), sont présents dans les lymphocytes et les monocytes (Albermann *et al.*, 2005 ; Laupèze *et al.*, 2001), ainsi qu'au niveau des barrières physiologiques [e.g. la barrière hémato-encéphalique (Löscher et Potschka, 2005 a et b)].

Les substrats de la Pgp et de la BCRP sont majoritairement hydrophobes, tandis que ceux des MRPs sont des anions amphiphiles, comme des conjugués avec le glutathion, l'acide glucuronique, ou le sulfate (Krishna et Mayer, 2000).

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'emtricitabine (Chapitre 1 *Résultats*), montrant qu'il pouvait être substrat des MRPs dans les CMSPs (majoritairement MRP1 et MRP5 dans notre système expérimental). Les données sur les INTIs sont rares. Seule une étude récente montre que l'AZT serait pris en charge par les MRPs au niveau des cellules endothéliales (cérébrales et aortiques) (Eilers *et al.*, 2008). Les métabolites monophosphorylés et le ténofovir semblent être transportés par la MRP4 (Schuetz *et al.*, 1999 ; Ray, 2005 ; Ray *et al.*, 2006). Le FTC, lui, entrerait dans la cellule par des transporteurs (Paff *et al.*, 1994). En effet, l'influx du FTC est saturable, et largement inhibé par le nitrobenzylthioinosine (NBMPR), un profil de transport caractéristique des nucléosides endogènes et de quelques analogues (Paterson et Cass, 1986 ; Paterson *et al.*, 1991). Il peut alors être soit efflué par les MRPs, soit phosphorylé par des enzymes cytosoliques ou mitochondriales.

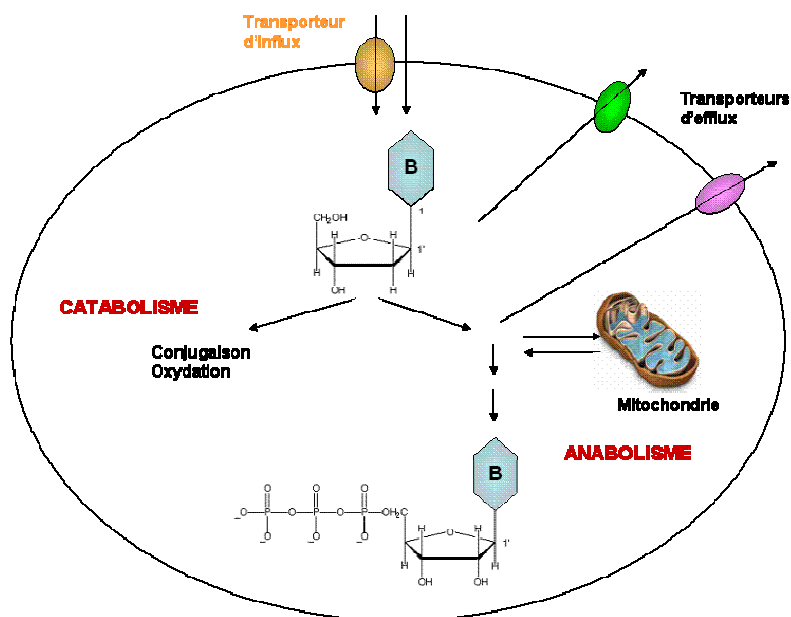


Figure 51 : Schéma générique du métabolisme des INTIs. Après entrée dans les cellules par diffusion passive ou par un transporteur d'influx (représenté en orange), les INTIs sont sujet à des voies anaboliques et cataboliques. Des études ont montré que les analogues monophosphorylés pouvaient être efflués de la cellule par la MRP4 (représentée en rose). Les réactions de phosphorylation peuvent être catalysées par des enzymes cytosoliques ou mitochondriales. Les formes triphosphorylées peuvent alors être incorporées par les polymérases virales ou de la cellule hôte, ce qui peut provoquer activité antivirale ou toxicité, respectivement. Les INTIs sont catabolisés et excrétés par divers mécanismes dont l'oxydation, la conjugaison, et les transporteurs d'efflux (Ray, 2005).

Lors de ce travail, nous avons également montré l'inhibition par le FTC, le TFV et l'EFV du transport médié par les MRPs (Chapitre 1 et 2 *Résultats*). Ces résultats sont en accord avec ceux de l'équipe de Weiss sur des lignées MDCKII surexprimant les transporteurs MRP1, MRP2 et MRP3 (Weiss *et al.*, 2007-b). Cette inhibition directe des transporteurs par les molécules étudiées, laissent envisager une éventuelle interaction entre les MRPs et ces mêmes molécules.

Même si les IPs ont été largement étudiés en tant que substrats des transporteurs d'efflux, les données au niveau du système nerveux central sont rares. Aucune étude ne fait part du rôle de la BCRP dans leur transport. Nous avons montré que l'atazanavir pouvait être pris en charge par la Pgp, les MRPs et la BCRP au niveau de la BHE (Chapitre 3 *Résultats*). Ces transporteurs pourraient jouer un rôle clé dans le passage de l'ATV dans le SNC, limitant son efficacité dans ce compartiment, réservoir viral important.

Impact des multi-thérapies anti-VIH sur l'expression et la fonctionnalité des transporteurs ABC

Les niveaux d'expression et de fonctionnalité de la Pgp et de la MRP1, ainsi que de l'expression des gènes *mdr1*, *mrp1*, *mrp5* et *mrp6*, sont très variables suivant les individus. Cette variabilité peut s'expliquer par le polymorphisme des gènes humains codant pour la Pgp et les MRPs 1, 5 et 6. Le polymorphisme dans l'exon 26 du gène *mdr1* semble corrélé avec son expression, pouvant expliquer la variabilité observée pour la Pgp (Cascorbi *et al.*, 2001 ; Hoffmeyer *et al.*, 2000). La répétition GCC dans la partie 5'UTR du gène *mrp1* a récemment été décrite comme étant polymorphe. Cette répétition pourrait être liée à d'autres séquences impliquées dans la régulation de l'expression constitutive ou induite de la MRP1 (Nicolis *et al.*, 2006). Peu de données sont disponibles sur la variabilité des gènes codant pour la MRP5 et la MRP6.

En ce qui concerne l'expression des protéines, la variabilité est plus importante dans les cellules fixées et perméabilisées que dans les cellules seulement fixées ; ceci pourrait être dû à un niveau de régulation supplémentaire pour l'adressage des transporteurs à la membrane, permettant de minimiser cette variabilité interindividuelle.

Il paraît néanmoins important de comprendre comment les variants génétiques des transporteurs d'efflux pourraient influencer sur les variations interindividuelles au niveau de l'absorption, de la biodistribution, du métabolisme et de l'élimination des médicaments.

Régulation de l'expression en ARNm des transporteurs ABC

En ce qui concerne la régulation en ARNm des transporteurs d'efflux dans les CMSPs, nous avons montré que le FTC induit l'expression du gène *mrp5* et que l'EFV induit l'expression des gènes *mrp1* et *mrp6*. Le TFV, lui, tend à réduire l'expression de tous les transporteurs présents, *mdr1*, *mrp1*, *mrp5* et *mrp6*. Ces résultats suggèrent un mécanisme de régulation différent entre les gènes des différents transporteurs (Chapitre 2 Résultats).

En effet, les récepteurs nucléaires, tels que le « constitutive androstane receptor » (CAR) et le « pregnane X receptor » (PXR), jouent un rôle important dans la régulation et l'induction des gènes *mdr1* et *mrp2* (Synold *et al.*, 2001 ; Kast *et al.*, 2002 ; Burk *et al.*, 2005). Les données concernant le gène *mrp1* sont rares et parfois contradictoires (Kauffmann *et al.*, 2002 ; Magnarin *et al.*, 2004). Les promoteurs des gènes *mrp1* et *mrp6* contiennent un site de liaison à Sp1 qui est impliqué dans la régulation de leur transcription (Jiang *et al.*, 2006 ; Muredda *et al.*, 2003). Le récepteur nucléaire Nfr-2, un facteur de transcription de réponse au stress oxydant, pourrait être requis pour l'expression constitutive et inductible du gène *mrp1* (Hayashi *et al.*, 2003).

Dans les CMSPs, l'expression des transporteurs ABC est corrélée à l'expression de PXR (Albermann *et al.*, 2005). Les facteurs de transcription Sp-1 et Nrf-2 sont exprimés de façon ubiquitaire dans les cellules de mammifères.

Il serait intéressant de voir l'effet des traitements sur ces différents facteurs de transcription et ainsi de découvrir les voies de régulation mises en place pour l'induction des différents gènes.

Régulation de l'expression protéique des transporteurs ABC

Nous nous sommes également intéressés à la régulation de l'expression protéique des transporteurs d'efflux. Nous avons ainsi pu démontrer que dans les CMSPs, quelque soit le traitement, il n'y avait aucun changement de l'expression protéique de la Pgp et de la MRP1, et ce, même si l'expression en ARNm variait (Chapitre 2 *Résultats*). Il n'y aurait pas de corrélation directe entre expression transcriptionnelle et expression protéique (Bergrenn *et al.*, 2007). D'autres niveaux de régulation pourraient intervenir au niveau post-transcriptionnel et traductionnel.

Nous avons observé une augmentation de l'expression de la Pgp et de la MRP1 en réponse au traitement par de l'ATV, au niveau des cellules endothéliales cérébrales mais pas au niveau des CMSPs (Chapitre 3 *Résultats*). Il y aurait donc un mode de régulation des transporteurs différent entre le SNC et la circulation systémique. Il serait intéressant de compléter ce travail par une étude comparative des niveaux d'expression des facteurs cellulaires (cytosoliques ou nucléaires) impliqués dans la régulation des transporteurs d'efflux, aux niveaux cérébral et sanguin.

Régulation de la fonctionnalité des transporteurs ABC

Nous avons pu observer que le FTC, le TFV et l'EFV pouvaient diminuer la fonctionnalité des MRPs (Chapitre 1 et 2 *Résultats*), tandis que l'ATV pouvait augmenter celle de la Pgp, dans les CMSPs (Chapitre 3 *Résultats*).

L'interaction des IPs avec la Pgp et les MRPs a été largement étudiée. Certaines études montrent qu'ils pourraient augmenter la fonctionnalité de la Pgp et de la MRP1 (Dupuis *et al.*, 2003 ; Perloff *et al.*, 2004). Cependant peu d'études concernent l'ATV. Nous nous y sommes donc intéressés, montrant qu'il pouvait augmenter la fonctionnalité de la Pgp à la fois au niveau des CMSPs et au niveau des cellules endothéliales cérébrales. Ces résultats sont intéressants et pourraient notamment expliquer et amplifier la faible biodisponibilité de l'ATV dans le SNC.

Les données concernant les interactions des INNTIs et des INTIs avec les transporteurs d'efflux sont peu nombreuses et parfois contradictoires. Nous avons montré que le FTC, le TFV, l'EFV, seuls ou associés en multi-thérapies ne modulaient pas la fonctionnalité de la Pgp. Ces résultats sont en accord

avec ceux de l'équipe de Berruet, qui montrent que les INNTIs ne sont ni inhibiteur ni inducteur de la Pgp (Berruet *et al.*, 2005). Par contre, une publication récente sur des lignées LS180 démontre qu'un traitement prolongé avec de fortes doses de FTC et d'EFV, mais pas de TFV, pouvait augmenter l'expression du gène *mdr1* et la fonctionnalité de la Pgp (Weiss *et al.*, 2008). Dans ce dernier cas, les cellules sont traitées de 3 à 7 jours avec des doses de l'ordre du millimolaire, soit 200 fois plus élevées que les nôtres (pour le FTC) (Weiss *et al.*, 2008).

Impact de la régulation des transporteurs ABC sur l'accumulation intracellulaire des ARV

Le travail présenté a permis de mettre en évidence une inhibition de l'activité des MRPs par le FTC, le TFV et l'EFV. Nous avons alors souhaité connaître les conséquences de cette modulation en termes de concentrations intracellulaires, à la fois des molécules elles-mêmes en association, mais aussi d'autres molécules associées, tels que les IPs (RTV, LPV, ATV).

Nous avons pu ainsi mettre en évidence une augmentation des concentrations intracellulaires de FTC et de TFV lorsqu'ils sont associés entre eux, et à l'EFV. Dans ce dernier cas, aucun changement n'est observé dans les concentrations d'EFV.

L'accumulation des ARV dans une cellule dépend de l'équilibre entre leurs propriétés physiologiques, leur transport par des protéines d'efflux, et leur affinité pour les protéines cytoplasmiques.

Le FTC et le TFV semblent être substrats des MRPs. Cette observation a été vérifiée dans le cas du FTC. Dans le cas du TFV, il a été préalablement montré qu'il pouvait être substrat de la MRP4 (Ray *et al.*, 2006) ; il pourrait donc être substrat de la MRP5 dans les CMSPs. En ce qui concerne l'EFV, il pourrait ne pas être substrat des transporteurs d'efflux, comme cela a déjà été montré pour la Pgp (Stormer *et al.*, 2002 ; Dirson *et al.*, 2006), et donc son transport pourrait être indépendant de la régulation de ces transporteurs.

Dans le cas de l'association du FTC avec les IPs (RTV, LPV, ATV), nous n'avons observé aucun changement des concentrations intracellulaires que les molécules soient seules ou bien associées entre elles. Pour expliquer cela, deux hypothèses peuvent être envisagées.

Les ratios concentration intracellulaire/concentration extracellulaire pour l'ATV, le LPV, le RTV indiquent qu'ils s'accumulent fortement dans la cellule. Une hiérarchie dans l'accumulation des IPs est observée (LPV > RTV > ATV), probablement liée à leurs caractéristiques physico-chimiques, telles que leur lipophilie ou leur liaison aux protéines plasmatiques et cytoplasmiques (Owen et Khoo, 2004). Le RTV et le LPV se lient à 99% aux protéines, l'ATV à 86% (Azoulay *et al.*, 2005). Les

concentrations intracellulaires de ces molécules sont très élevées, elles pourraient donc saturer les transporteurs d'efflux.

Les IPs pourraient au contraire être substrats de plusieurs transporteurs (Lee *et al.*, 1998 ; Seelig *et al.*, 2000 ; Huisman *et al.*, 2001), des phénomènes de compensation entre les différentes pompes pourraient donc intervenir.

Conclusion et perspectives

En conclusion, ce travail a révélé la pertinence et l'importance de l'étude de la Pgp, des MRPs et de la BCRP dans la pharmacologie cellulaire et la biodistribution des antirétroviraux.

Il a permis de mettre en évidence une différence d'expression et de fonctionnalité des transporteurs entre les cellules circulantes et les cellules endothéliales cérébrales. Il a apporté des informations sur certains paramètres pharmacologiques, tels que l'entrée, la liaison protéique, l'accumulation dans une cellule, l'efflux de certains antirétroviraux.

Le modèle *in vitro* de BHE humaine a permis de mettre en évidence le passage de l'ATV dans le SNC et sa prise en charge par les transporteurs d'efflux. Au niveau cérébral, l'ATV augmente à la fois l'expression et la fonctionnalité de la Pgp. Il serait intéressant de connaître les conséquences d'une association avec d'autres antirétroviraux à la fois sur cette expression et cette fonctionnalité.

Au niveau périphérique, nous avons montré le bénéfice d'une association FTC+TFV+EFV en termes de concentrations intracellulaires dans les CMSPs. Il serait également pertinent de regarder les conséquences d'une telle association sur le passage des molécules à travers la BHE.

Ce modèle de BHE *in vitro* pourrait également permettre d'évaluer la perméabilité d'autres molécules et de cribler les molécules les plus intéressantes pouvant agir au niveau cérébral. Certaines molécules étant inhibitrices des transporteurs d'efflux, elles pourraient permettre en association avec d'autres, d'augmenter leur passage dans le compartiment cérébral. Il faut, cependant, rester prudent, car ces transporteurs jouent un rôle physiologique de protection du SNC. Par exemple, dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, la Pgp limiterait l'accumulation des plaques β -amyloïdes (Cirrito *et al.*, 2005). Elle limite également l'entrée dans le SNC de toxines, comme des pesticides, des toxines urémiques (chez des patients insuffisants rénaux) (Ohtsuki *et al.*, 2002)...

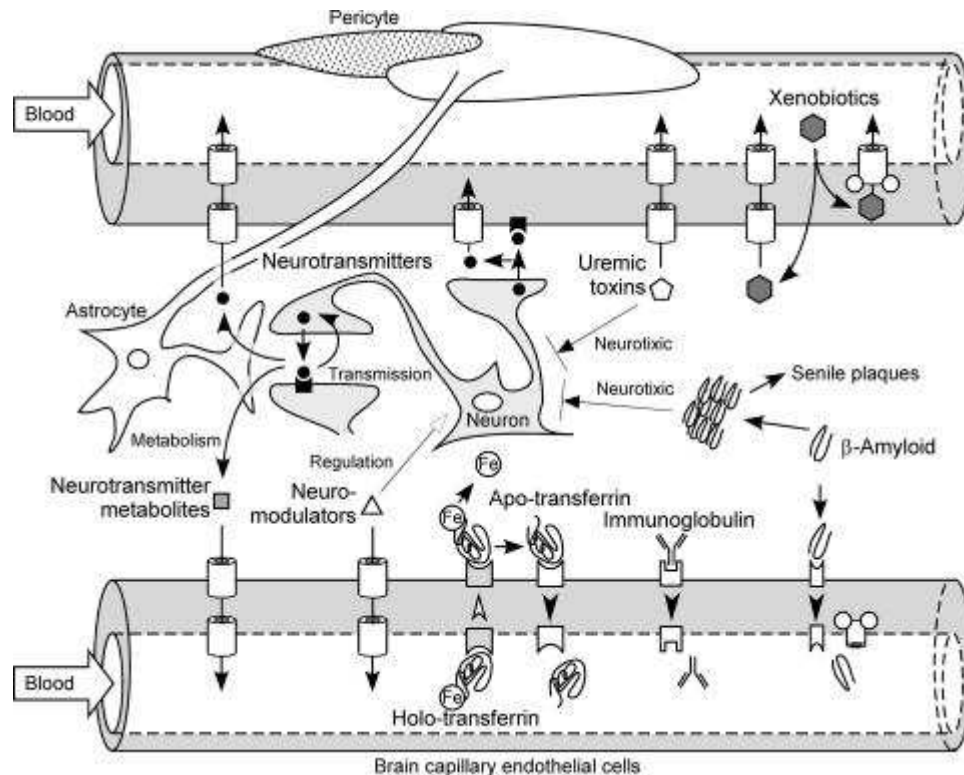


Figure 52 : Rôle physiologique hypothétique du système de transport d'efflux de la BHE (Terasaki and Ohtsuki, 2005)

Il pourrait être intéressant de réaliser ces mêmes expériences *in vitro* dans un contexte physiopathologique d'infection par le VIH. En effet, l'expression des transporteurs semble être augmentée chez les patients VIH-positifs (Turriziani *et al.*, 2008). Il serait donc également pertinent d'évaluer l'influence des transporteurs ABC chez ces mêmes patients sous multi-thérapies anti-VIH. Pour l'instant, il n'a pas été observé de différence d'expression ou de fonctionnalité de la Pgp chez les patients sous thérapie hautement active (Lucia *et al.*, 2002 ; Bossi *et al.*, 2003 ; Ford *et al.*, 2003). Seule une équipe a montré une diminution de la fonctionnalité de la Pgp chez des patients traités avec du LPV boosté par du RTV (Wyen *et al.*, 2008). Aucune étude n'a été réalisée sur les MRPs ainsi que sur l'association FTC-TFV-EFV.

Il serait pertinent de suivre l'expression et la fonctionnalité des transporteurs sur le long court, chez des patients infectés par le VIH sous multi-thérapie. Il n'existe à ce jour, aucune étude longitudinale de ce type. C'est dans ce but que nous avons débuté une étude, en collaboration avec le service du Pr. Girard à l'hôpital Saint-Antoine, sur des patients préalablement traités avec du 3TC, du TFV et de l'EFV ou du RTV/LPV, ayant changé à J0 le 3TC par le FTC. Ces patients ont été suivis au mois 1, 3 et 6. Des expériences sont en cours de réalisation sur l'expression des transporteurs en RT-PCR, et sur l'accumulation des antirétroviraux dans les CMSPs.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Aarnoutse RE, Schapiro JM, Boucher CA, Hekster YA, Burger DM

Therapeutic drug monitoring: an aid to optimising response to antiretroviral drugs?

Drugs. 2003;63(8):741-53

Abbott NJ, Hughes CC, Revest PA, Greenwood J

Development and characterisation of a rat brain capillary endothelial culture: towards an in vitro blood-brain barrier

J Cell Sci. 1992 Sep;103 (Pt 1):23-37

Acosta EP

Pharmacokinetic enhancement of protease inhibitors

J Acquir Immune Defic Syndr. 2002 Feb 1;29 Suppl 1:S11-8

Adjé-Touré CA, Cheingsong R, Garcia-Lerma JG, Eholié S, Borget MY, Bouchez JM, Otten RA, Maurice C, Sassan-Morokro M, Ekpini RE, Nolan M, Chorba T, Heneine W, Nkengasong JN

Antiretroviral therapy in HIV-2-infected patients: changes in plasma viral load, CD4+ cell counts, and drug resistance profiles of patients treated in Abidjan, Côte d'Ivoire

AIDS. 2003 Jul;17 Suppl 3:S49-54

Agarwal S, Pal D, Mitra AK

Both P-gp and MRP2 mediate transport of Lopinavir, a protease inhibitor

Int J Pharm. 2007 Jul 18;339(1-2):139-47

Akeb F, Ferrua B, Creminon C, Roptin C, Grassi J, Nevers MC, Guedj R, Garraffo R, Duval D

Quantification of plasma and intracellular levels of the HIV protease inhibitor ritonavir by competitive ELISA

J Immunol Methods. 2002 May 1;263(1-2):1-9

Akira S, Kishimoto T

IL-6 and NF-IL6 in acute-phase response and viral infection

Immunol Rev. 1992 Jun;127:25-50

Akira S, Kishimoto T

NF-IL6 and NF-kappa B in cytokine gene regulation

Adv Immunol. 1997;65:1-46

Ala PJ, Huston EE, Klabe RM, McCabe DD, Duke JL, Rizzo CJ, Korant BD, DeLoskey RJ, Lam PY, Hodge CN, Chang CH

Molecular basis of HIV-1 protease drug resistance: structural analysis of mutant proteases complexed with cyclic urea inhibitors

Biochemistry. 1997 Feb 18;36(7):1573-80

Albermann N, Schmitz-Winnenthal FH, Z'graggen K, Volk C, Hoffmann MM, Haefeli WE, Weiss J

Expression of the drug transporters MDR1/ABCB1, MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, BCRP/ABCG2, and PXR in peripheral blood mononuclear cells and their relationship with the expression in intestine and liver

Biochem Pharmacol. 2005 Sep 15;70(6):949-58

Albright AV, Strizki J, Harouse JM, Lavi E, O'Connor M, González-Scarano F

HIV-1 infection of cultured human adult oligodendrocytes

Virology. 1996 Mar 1;217(1):211-9

Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA

CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1

Science. 1996, 272(5270):1955-8

Allen JD, van Loevezijn A, Lakhai JM, van der Valk M, van Tellingen O, Reid G, Schellens JH, Koomen GJ, Schinkel AH

Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C
Mol Cancer Ther. 2002 Apr;1(6):417-25

Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, Dean M

A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance
Cancer Res. 1998 Dec 1;58(23):5337-9

Almond LM, Edirisinghe D, Dalton M, Bonington A, Back DJ, Khoo SH

Intracellular and plasma pharmacokinetics of nevirapine in human immunodeficiency virus-infected individuals
Clin Pharmacol Ther. 2005 Aug;78(2):132-42

Alvarez Losada S, Cantó-Nogués C, Muñoz-Fernández MA

A new possible mechanism of human immunodeficiency virus type 1 infection of neural cells
Neurobiol Dis. 2002 Dec;11(3):469-78

An SF, Giometto B, Scaravilli F

HIV-1 DNA in brains in AIDS and pre-AIDS: correlation with the stage of disease
Ann Neurol. 1996 Oct;40(4):611-7

An SF, Groves M, Gray F, Scaravilli F

Early entry and widespread cellular involvement of HIV-1 DNA in brains of HIV-1 positive asymptomatic individuals
J Neuropathol Exp Neurol. 1999 Nov;58(11):1156-62

Anderson JM

Cell signalling: MAGUK magic
Curr Biol. 1996 Apr 1;6(4):382-4

Anderson PL, Brundage RC, Bushman L, Kakuda TN, Remmel RP, Fletcher CV

Indinavir plasma protein binding in HIV-1-infected adults
AIDS. 2000 Oct 20;14(15):2293-7

Anderson PL, Brundage RC, Kakuda TN, Fletcher CV (a)

CD4 response is correlated with peak plasma concentrations of indinavir in adults with undetectable human immunodeficiency virus ribonucleic acid
Clin Pharmacol Ther. 2002 Apr;71(4):280-5

Anderson PL, Kakuda TN, Kawle S, Fletcher CV

Antiviral dynamics and sex differences of zidovudine and lamivudine triphosphate concentrations in HIV-infected individuals
AIDS. 2003 Oct 17;17(15):2159-68

Anderson E, Zink W, Xiong H, Gendelman HE (b)

HIV-1-associated dementia: a metabolic encephalopathy perpetrated by virus-infected and immune-competent mononuclear phagocytes
J Acquir Immune Defic Syndr. 2002 Oct 1;31 Suppl 2:S43-54

Andreana A, Aggarwal S, Gollapudi S, Wien D, Tsuruo T, Gupta S

Abnormal expression of a 170-kilodalton P-glycoprotein encoded by MDR1 gene, a metabolically active efflux pump, in CD4+ and CD8+ T cells from patients with human immunodeficiency virus type 1 infection
AIDS Res Hum Retroviruses. 1996 Oct 10;12(15):1457-62

Anthonypillai C, Gibbs JE, Thomas SA

The distribution of the anti-HIV drug, tenofovir (PMPA), into the brain, CSF and choroid plexuses
Cerebrospinal Fluid Res. 2006 Jan 3;3:1

Anthonypillai C, Sanderson RN, Gibbs JE, Thomas SA

The distribution of the HIV protease inhibitor, ritonavir, to the brain, cerebrospinal fluid, and choroid plexuses of the guinea pig

J Pharmacol Exp Ther. 2004 Mar;308(3):912-20

Antonelli G, Turriziani O, Cianfriglia M, Riva E, Dong G, Fattorossi A, Dianzani F

Resistance of HIV-1 to AZT might also involve the cellular expression of multidrug resistance P-glycoprotein

AIDS Res Hum Retroviruses. 1992 Oct;8(10):1839-44

Arribas JR, Pozniak AL, Gallant JE, Dejesus E, Gazzard B, Campo RE, Chen SS, McColl D, Holmes CB, Enejosa J, Toole JJ, Cheng AK

Tenofovir disoproxil fumarate, emtricitabine, and efavirenz compared with zidovudine/lamivudine and efavirenz in treatment-naïve patients: 144-week analysis

J Acquir Immune Defic Syndr. 2008 Jan 1;47(1):74-8

Askjaer P, Jensen TH, Nilsson J, Englmeier L, Kjems J.

The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP

J Biol Chem., 1998, 273(50):33414-22

Aungst BJ

P-glycoprotein, secretory transport, and other barriers to the oral delivery of anti-HIV drugs

Adv Drug Deliv Rev. 1999 Oct 18;39(1-3):105-116

Azoulay S, Duval D, Guedj R

Pharmacodynamie plasmatique et intracellulaire des antirétroviraux anti-VIH

Virologie. 2005 Nov Dec ; 9(6):473-482

Azoulay S, Nevers MC, Créminon C, Heripret L, Garraffo R, Durant J, Dellamonica P, Grassi J, Guedj R, Duval D (a)

An enzyme immunoassay for the quantification of plasma and intracellular lopinavir in HIV-infected patients

J Immunol Methods. 2004 Dec;295(1-2):37-48

Azoulay S, Nevers MC, Créminon C, Heripret L, Durant J, Dellamonica P, Grassi J, Guedj R, Duval D (b)
Sensitive enzyme immunoassay for measuring plasma and intracellular nevirapine levels in human immunodeficiency virus-infected patients

Antimicrob Agents Chemother. 2004 Jan;48(1):104-9

B

Bachmeier CJ, Spitzenberger TJ, Elmquist WF, Miller DW

Quantitative assessment of HIV-1 protease inhibitor interactions with drug efflux transporters in the blood-brain barrier

Pharm Res. 2005 Aug;22(8):1259-68

Bagasra O, Lavi E, Bobroski L, Khalili K, Pestaner JP, Tawadros R, Pomerantz RJ

Cellular reservoirs of HIV-1 in the central nervous system of infected individuals: identification by the combination of in situ polymerase chain reaction and immunohistochemistry

AIDS. 1996 Jun;10(6):573-85

Bähr O, Wick W, Weller M

Modulation of MDR/MRP by wild-type and mutant p53

J Clin Invest. 2001 Mar;107(5):643-6

Bakhanashvili M, Avidan O, Hizi A

Mutational studies of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: the involvement of residues 183 and 184 in the fidelity of DNA synthesis

FEBS Lett. 1996 Aug 12;391(3):257-62

Balda MS, Flores-Maldonado C, Cereijido M, Matter K

Multiple domains of occludin are involved in the regulation of paracellular permeability
J Cell Biochem. 2000 Apr;78(1):85-96

Balimane PV, Sinko PJ

Involvement of multiple transporters in the oral absorption of nucleoside analogues
Adv Drug Deliv Rev. 1999 Oct 18;39(1-3):183-209

Bangsberg DR, Charlebois ED, Grant RM, Holodniy M, Deeks SG, Perry S, Conroy KN, Clark R, Guzman D, Zolopa A, Moss A.

High levels of adherence do not prevent accumulation of HIV drug resistance mutations
AIDS. 2003, 17(13):1925-32

Banks WA

Physiology and pathology of the blood-brain barrier: implications for microbial pathogenesis, drug delivery and neurodegenerative disorders
J Neurovirol. 1999 Dec;5(6):538-55

Banks WA, Akerstrom V, Kastin AJ

Adsorptive endocytosis mediates the passage of HIV-1 across the blood-brain barrier: evidence for a post-internalization coreceptor
J Cell Sci. 1998 Feb;111 (Pt 4):533-40

Banks WA, Robinson SM, Wolf KM, Bess JW Jr, Arthur LO

Binding, internalization, and membrane incorporation of human immunodeficiency virus-1 at the blood-brain barrier is differentially regulated
Neuroscience. 2004;128(1):143-53

Barré-Sinoussi F.

HIV as the cause of AIDS
Lancet. 1996, 348(9019):31-5

Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dautet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L.

Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)
Science. 1983, 220(4599):868-71

Bartlett JA, DeMasi R, Quinn J, Moxham C, Rousseau F

Overview of the effectiveness of triple combination therapy in antiretroviral-naïve HIV-1 infected adults
AIDS. 2001 Jul 27;15(11):1369-77

Bauer B, Hartz AM, Fricker G, Miller DS

Pregnane X receptor up-regulation of P-glycoprotein expression and transport function at the blood-brain barrier
Mol Pharmacol. 2004 Sep;66(3):413-9

Bauer B, Hartz AM, Fricker G, Miller DS

Modulation of p-glycoprotein transport function at the blood-brain barrier
Exp Biol Med (Maywood). 2005 Feb;230(2):118-27

Becher F, Landman R, Mboup S, Kane CN, Canestri A, Liegeois F, Vray M, Prevot MH, Leleu G, Benech H

Monitoring of didanosine and stavudine intracellular trisphosphorylated anabolite concentrations in HIV-infected patients
AIDS. 2004 Jan 23;18(2):181-7

Begley DJ

Understanding and circumventing the blood-brain barrier
Acta Paediatr Suppl. 2003 Dec;92(443):83-91

Begley DJ

Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities
Pharmacol Ther. 2004 Oct;104(1):29-45

Begley DJ, Brightman MW

Structural and functional aspects of the blood-brain barrier
Prog Drug Res. 2003;61:39-78

Belinsky MG, Chen ZS, Shchaveleva I, Zeng H, Kruh GD

Characterization of the drug resistance and transport properties of multidrug resistance protein 6 (MRP6, ABCC6)
Cancer Res. 2002 Nov 1;62(21):6172-7

Bellamy WT

P-glycoproteins and multidrug resistance
Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1996;36:161-83

Belliard AM, Tardivel S, Farinotti R, Lacour B, Leroy C

Effect of hr-IL2 treatment on intestinal P-glycoprotein expression and activity in Caco-2 cells
J Pharm Pharmacol. 2002 Aug;54(8):1103-9

Benech H, Théodoro F, Herbet A, Page N, Schlemmer D, Pruvost A, Grassi J, Deverre JR

Peripheral blood mononuclear cell counting using a DNA-detection-based method
Anal Biochem. 2004 Jul 1;330(1):172-4

Berggren S, Gall C, Wollnitz N, Ekelund M, Karlbom U, Hoogstraate J, Schrenk D, Lennernäs H

Gene and protein expression of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and CYP3A4 in the small and large human intestine
Mol Pharm. 2007 Mar-Apr;4(2):252-7

Berruet N, Sentenac S, Auchere D, Gimenez F, Farinotti R, Fernandez C

Effect of efavirenz on intestinal p-glycoprotein and hepatic p450 function in rats
J Pharm Pharm Sci. 2005 Aug 4;8(2):226-34

Betz AL, Firth JA, Goldstein GW

Polarity of the blood-brain barrier: distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells
Brain Res. 1980 Jun 16;192(1):17-28

Blaise P, Clevenbergh P, Vaira D, Moutschen M, Dellamonica P

HIV resistance to antiretroviral drugs: mechanisms, genotypic and phenotypic resistance testing in clinical practice
Acta Clin Belg. 2002 Jul-Aug;57(4):191-201

Blankson JN, Persaud D, Siliciano RF

The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection
Annu Rev Med. 2002;53:557-93

Bobardt MD, Salmon P, Wang L, Esko JD, Gabuzda D, Fiala M, Trono D, Van der Schueren B, David G, Gallay PA

Contribution of proteoglycans to human immunodeficiency virus type 1 brain invasion
J Virol. 2004 Jun;78(12):6567-84

Boesch D, Gaveriaux C, Jachez B, Pourtier-Manzanedo A, Bollinger P, Loor F.

In vivo circumvention of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of tumor cells with SDZ PSC 833
Cancer Res., 1991, 51(16):4226-33

Boffito M, Winston A, Jackson A, Fletcher C, Pozniak A, Nelson M, Moyle G, Tolowinska I, Hoetelmans R, Miralles D, Gazzard B

Pharmacokinetics and antiretroviral response to darunavir/ritonavir and etravirine combination in patients with high-level viral resistance

AIDS. 2007 Jul 11;21(11):1449-55.

Boone LR

Next-generation HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors

Curr Opin Investig Drugs. 2006 Feb;7(2):128-35

Borrito-Esoda K, Parkin N, Miller MD

A comparison of the phenotypic susceptibility profiles of emtricitabine and lamivudine

Antivir Chem Chemother. 2007;18(5):297-300

Borrito-Esoda K, Vela JE, Myrick F, Ray AS, Miller MD

In vitro evaluation of the anti-HIV activity and metabolic interactions of tenofovir and emtricitabine

Antivir Ther. 2006;11(3):377-84

Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J

The multidrug resistance protein family

Biochim Biophys Acta. 1999 Dec 6;1461(2):347-57

Bossi P, Legrand O, Faussat AM, Legrand M, Bricaire F, Marie JP, Agut H, Diquet B, Katlama C, Huraux JM, Calvez V

P-glycoprotein in blood CD4 cells of HIV-1-infected patients treated with protease inhibitors

HIV Med. 2003 Jan;4(1):67-71

Bosch I, Croop J

P-glycoprotein multidrug resistance and cancer

Biochim Biophys Acta. 1996; 1288(2):F37-54

Bréchet JM, Hurbain I, Fajac A, Daty N, Bernaudin JF

Different pattern of MRP localization in ciliated and basal cells from human bronchial epithelium

J Histochem Cytochem. 1998 Apr;46(4):513-7

Breilh D, Pellegrin I, Rouzès A, Berthoin K, Xuereb F, Budzinski H, Munck M, Fleury HJ, Saux MC, Pellegrin JL

Virological, intracellular and plasma pharmacological parameters predicting response to lopinavir/ritonavir (KALEPHAR study)

AIDS. 2004 Jun 18;18(9):1305-10

Briggs JA, Wilk T, Welker R, Krausslich HG, Fuller SD.

Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores

EMBO J. 2003; 22(7):1707-15

Brightman MW, Reese TS

Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain

J Cell Biol. 1969 Mar;40(3):648-77

Brodine SK, Mascola JR, Weiss PJ, Ito SI, Porter KR, Artenstein AW, Garland FC, McCutchan FE, Burke DS

Detection of diverse HIV-1 genetic subtypes in the USA

Lancet. 1995 Nov 4;346(8984):1198-9

Brundage RC, Yong FH, Fenton T, Spector SA, Starr SE, Fletcher CV

Inpatient variability of efavirenz concentrations as a predictor of virologic response to antiretroviral therapy

Antimicrob Agents Chemother. 2004 Mar;48(3):979-84

Büchler M, König J, Brom M, Kartenbeck J, Spring H, Horie T, Keppler D

cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats
J Biol Chem. 1996 Jun 21;271(25):15091-8

Bukrinsky MI, Nottet HS, Schmidtayerova H, Dubrovsky L, Flanagan CR, Mullins ME, Lipton SA, Gendelman HE

Regulation of nitric oxide synthase activity in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected monocytes: implications for HIV-associated neurological disease
J Exp Med. 1995 Feb 1;181(2):735-45

Bukrinsky MI, Stanwick TL, Dempsey MP, Stevenson M

Quiescent T lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection
Science. 1991 Oct 18;254(5030):423-7

Buonaguro L, Tagliamonte M, Tornesello ML, Buonaguro FM

Genetic and phylogenetic evolution of HIV-1 in a low subtype heterogeneity epidemic: the Italian example
Retrovirology. 2007 May 21;4:34

Burger DM, Hoetelmans RM, Hugén PW, Mulder JW, Meenhorst PL, Koopmans PP, Brinkman K, Keuter M, Dolmans W, Hekster YA

Low plasma concentrations of indinavir are related to virological treatment failure in HIV-1-infected patients on indinavir-containing triple therapy
Antivir Ther. 1998;3(4):215-20

Burk O, Arnold KA, Geick A, Tegude H, Eichelbaum M

A role for constitutive androstane receptor in the regulation of human intestinal MDR1 expression
Biol Chem. 2005 Jun;386(6):503-13

Butera ST

Therapeutic targeting of human immunodeficiency virus type-1 latency: current clinical realities and future scientific possibilities
Antiviral Res. 2000 Dec;48(3):143-76

C

Camus M, Deloménie C, Didier N, Faye A, Gil S, Dauge MC, Mabondzo A, Farinotti R

Increased expression of MDR1 mRNAs and P-glycoprotein in placentas from HIV-1 infected women
Placenta. 2006 Jun-Jul;27(6-7):699-706

Carmona R, Pérez-Alvarez L, Muñoz M, Casado G, Delgado E, Sierra M, Thomson M, Vega Y, Vázquez de Parga E, Contreras G, Medrano L, Nájera R

Natural resistance-associated mutations to Enfuvirtide (T20) and polymorphisms in the gp41 region of different HIV-1 genetic forms from T20 naive patients
J Clin Virol. 2005 Mar;32(3):248-53

Cascorbi I

Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs
Pharmacol Ther. 2006 Nov;112(2):457-73

Cascorbi I, Gerloff T, Johne A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Roots I

Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects
Clin Pharmacol Ther. 2001 Mar;69(3):169-74

Cavert W, Notermans DW, Staskus K, Wietgreffe SW, Zupancic M, Gebhard K, Henry K, Zhang ZQ, Mills R, McDade H, Schuwirth CM, Goudsmit J, Danner SA, Haase AT
Kinetics of response in lymphoid tissues to antiretroviral therapy of HIV-1 infection
Science. 1997 May 9;276(5314):960-4

Chandler B, Almond L, Ford J, Owen A, Hoggard P, Khoo S, Back D
The effects of protease inhibitors and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors on p-glycoprotein expression in peripheral blood mononuclear cells in vitro
J Acquir Immune Defic Syndr. 2003 Aug 15;33(5):551-6

Chang G, Roth CB
Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters
Science. 2001 Sep 7;293(5536):1793-800

Chang M, Sood VK, Wilson GJ, Kloosterman DA, Sanders PE, Hauer MJ, Zhang W, Branstetter DG
Metabolism of the HIV-1 reverse transcriptase inhibitor delavirdine in mice
Drug Metab Dispos. 1997 Jul;25(7):828-39

Chaudhary PM, Roninson IB
Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells
Cell. 1991; 66(1):85-94

Chaudhary PM, Mechetner EB, Roninson IB.
Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes
Blood. 1992; 80(11):2735-9

Chen RY, Kilby JM, Saag MS
Enfuvirtide
Expert Opin Investig Drugs. 2002 Dec;11(12):1837-43

Chen CH, Vazquez-Padua M, Cheng YC
Effect of anti-human immunodeficiency virus nucleoside analogs on mitochondrial DNA and its implication for delayed toxicity
Mol Pharmacol. 1991 May;39(5):625-8

Chiu YL, Soros VB, Kreisberg JF, Stopak K, Yonemoto W, Greene WC.
Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells
Nature. 2005 May 5;435(7038):108-14

Choudhuri S, Klaassen CD
Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters
Int J Toxicol. 2006 Jul-Aug;25(4):231-59

Chun TW, Carruth L, Finzi D, Shen X, DiGiuseppe JA, Taylor H, Hermankova M, Chadwick K, Margolick J, Quinn TC, Kuo YH, Brookmeyer R, Zeiger MA, Barditch-Crovo P, Siliciano RF.
Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection
Nature. 1997 May 8;387(6629):183-8

Chun TW, Engel D, Berrey MM, Shea T, Corey L, Fauci AS
Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection
Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Jul 21;95(15):8869-73

Chun TW, Fauci AS
Latent reservoirs of HIV: obstacles to the eradication of virus
Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Sep 28;96(20):10958-61

Cianfriglia M, Dupuis ML, Molinari A, Verdoliva A, Costi R, Galluzzo CM, Andreotti M, Cara A, Di Santo R, Palmisano L

HIV-1 integrase inhibitors are substrates for the multidrug transporter MDR1-P-glycoprotein
Retrovirology. 2007 Mar 7;4:17

Cirrito JR, Deane R, Fagan AM, Spinner ML, Parsadanian M, Finn MB, Jiang H, Prior JL, Sagare A, Bales KR, Paul SM, Zlokovic BV, Piwnica-Worms D, Holtzman DM

P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid-beta deposition in an Alzheimer disease mouse model
J Clin Invest. 2005 Nov;115(11):3285-90

Clapham PR, Weiss RA

Immunodeficiency viruses. Spoilt for choice of co-receptors
Nature. 1997, 388(6639):230-1

Clavel F, Guyader M, Guetard D, Salle M, Montagnier L, Alizon M

Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2
Nature. 1986, 324(6098):691-5

Clavel F, Hance AJ

HIV drug resistance
N Engl J Med. 2004, 350(10):1023-35

Clevenbergh P, Mouly S, Sellier P, Badsì E, Cervoni J, Vincent V, Trout H, Bergmann JF

Improving HIV infection management using antiretroviral plasma drug levels monitoring: a clinician's point of view
Curr HIV Res. 2004 Oct;2(4):309-21

Clouse KA, Powell D, Washington I, Poli G, Strebel K, Farrar W, Barstad P, Kovacs J, Fauci AS, Folks TM

Monokine regulation of human immunodeficiency virus-1 expression in a chronically infected human T cell clone
J Immunol. 1989 Jan 15;142(2):431-8

Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P

Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells
Science. 1995 Dec 15;270(5243):1811-5

Cole SP

The 1991 Merck Frosst Award. Multidrug resistance in small cell lung cancer
Can J Physiol Pharmacol. 1992 Mar;70(3):313-29

Colonno R, Rose R, McLaren C

Identification of I50L as the signature atazanavir (ATV)-resistance mutation in treatment-naïve HIV-1-infected patients receiving ATV-containing regimens
J Infect Dis. 2004, 189: 1802-1810

Condra JH, Petropoulos CJ, Ziermann R, Schleif WA, Shivaprakash M, Emini EA

Drug resistance and predicted virologic responses to human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor therapy
J Infect Dis. 2000 Sep;182(3):758-65

Coombs RW, Speck CE, Hughes JP, Lee W, Sampoleo R, Ross SO, Dragavon J, Peterson G, Hooton TM, Collier AC, Corey L, Koutsky L, Krieger JN

Association between culturable human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in semen and HIV-1 RNA levels in semen and blood: evidence for compartmentalization of HIV-1 between semen and blood
J Infect Dis. 1998 Feb;177(2):320-30

Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR, Bertino JR

Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites
Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Jan;86(2):695-8

Cornwell MM, Smith DE

SP1 activates the MDR1 promoter through one of two distinct G-rich regions that modulate promoter activity
J Biol Chem. 1993, 268(26):19505-11

Crowe SM, Sonza S.

HIV-1 can be recovered from a variety of cells including peripheral blood monocytes of patients receiving highly active antiretroviral therapy: a further obstacle to eradication
J Leukoc Biol. 2000 Sep;68(3):345-50

D

D'Angelo J, Mouscadet JF, Desmaële D, Zouhiri F, Leh H

HIV-1 integrase: the next target for AIDS therapy?
Pathol Biol (Paris). 2001 Apr;49(3):237-46

Dallas S, Miller DS, Bendayan R

Multidrug resistance-associated proteins: expression and function in the central nervous system
Pharmacol Rev. 2006 Jun;58(2):140-61

Dallasta LM, Pisarov LA, Esplen JE, Werley JV, Moses AV, Nelson JA, Achim CL

Blood-brain barrier tight junction disruption in human immunodeficiency virus-1 encephalitis
Am J Pathol. 1999 Dec;155(6):1915-27

Dean M, Hamon Y, Chimini G

The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily
J Lipid Res. 2001 Jul;42(7):1007-17

De Clercq E

The role of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in the therapy of HIV-1 infection
Antiviral Res. 1998 Jun;38(3):153-79

De Meyer S, Azijn H, Surleraux D, Jochmans D, Tahri A, Pauwels R, Wigerinck P, de Béthune MP

TMC114, a novel human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor active against protease inhibitor-resistant viruses, including a broad range of clinical isolates
Antimicrob Agents Chemother. 2005 Jun;49(6):2314-21

Dejana E

Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis
J Clin Invest. 1996 Nov 1;98(9):1949-53

Deli MA, Joó F

Cultured vascular endothelial cells of the brain
Keio J Med. 1996 Sep;45(3):183-98

Delfraissy JF

Prise en charge thérapeutique des personnes infectées par le VIH
Rapport 2004, Médecine-Sciences, Flammarion

Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR

Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1
Nature. 1996, 381(6584):661-6

Dickson DW

Multinucleated giant cells in acquired immunodeficiency syndrome encephalopathy. Origin from endogenous microglia?

Arch Pathol Lab Med. 1986 Oct;110(10):967-8

Dirson G, Fernandez C, Hindlet P, Roux F, German-Fattal M, Gimenez F, Farinotti R

Efavirenz does not interact with the ABCB1 transporter at the blood-brain barrier.

Pharm Res. 2006 Jul;23(7):1525-32

Doms RW, Earl PL, Moss B

The assembly of the HIV-1 env glycoprotein into dimers and tetramers

Adv Exp Med Biol. 1991, 300:203-19

Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD

A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells

Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Dec 22;95(26):15665-70

Drach J, Gsur A, Hamilton G, Zhao S, Angerler J, Fiegl M, Zojer N, Raderer M, Haberl I, Andreeff M, Huber H

Involvement of P-glycoprotein in the transmembrane transport of interleukin-2 (IL-2), IL-4, and interferon-gamma in normal human T lymphocytes

Blood. 1996, 88(5):1747-54

Drach D, Zhao S, Drach J, Mahadevia R, Gatringer C, Huber H, Andreeff M

Subpopulations of normal peripheral blood and bone marrow cells express a functional multidrug resistant phenotype.

Blood. 1992 Dec 1;80(11):2729-34

Dresser GK, Schwarz UI, Wilkinson GR, Kim RB

Coordinate induction of both cytochrome P4503A and MDR1 by St John's wort in healthy subjects

Clin Pharmacol Ther. 2003 Jan;73(1):41-50

Drewe J, Gutmann H, Fricker G, Török M, Beglinger C, Huwylar J

HIV protease inhibitor ritonavir: a more potent inhibitor of P-glycoprotein than the cyclosporine analog SDZ PSC 833

Biochem Pharmacol. 1999 May 15;57(10):1147-52

Drewes LR

What is the blood-brain barrier? A molecular perspective. Cerebral vascular biology

Adv Exp Med Biol. 1999;474:111-22

Dueweke TJ, Pushkarskaya T, Poppe SM, Swaney SM, Zhao JQ, Chen IS, Stevenson M, Tarpley WG

A mutation in reverse transcriptase of bis(heteroaryl)piperazine-resistant human immunodeficiency virus type 1 that confers increased sensitivity to other nonnucleoside inhibitors.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 May 15;90(10):4713-7

Dumon C, Solas C, Thuret I, Chambost H, Lacarelle B, Michel G, Durand A

Relationship between efficacy, tolerance, and plasma drug concentration of ritonavir in children with advanced HIV infection

Ther Drug Monit. 2000 Aug;22(4):402-8

Duong M, Buisson M, Peytavin G, Kohli E, Piroth L, Martha B, Grappin M, Chavanet P, Portier H

Low trough plasma concentrations of nevirapine associated with virologic rebounds in HIV-infected patients who switched from protease inhibitors

Ann Pharmacother. 2005 Apr;39(4):603-9

Dupuis ML, Flego M, Molinari A, Cianfriglia M

Saquinavir induces stable and functional expression of the multidrug transporter P-glycoprotein in human CD4 T-lymphoblastoid CEMrev cells
HIV Med. 2003 Oct;4(4):338-45

Dussault I, Lin M, Hollister K, Wang EH, Synold TW, Forman BM

Peptide mimetic HIV protease inhibitors are ligands for the orphan receptor SXR
J Biol Chem. 2001 Sep 7;276(36):33309-12

E

Ee PL, He X, Ross DD, Beck WT

Modulation of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) gene expression using RNA interference
Mol Cancer Ther. 2004 Dec;3(12):1577-83

Eilers M, Roy U, Mondal D

MRP (ABCC) transporters-mediated efflux of anti-HIV drugs, saquinavir and zidovudine, from human endothelial cells
Exp Biol Med (Maywood). 2008 Jun 5

Ensoli F, Cafaro A, Fiorelli V, Vannelli B, Ensoli B, Thiele CJ

HIV-1 infection of primary human neuroblasts
Virology. 1995 Jun 20;210(1):221-5

Eugenin EA, Osiecki K, Lopez L, Goldstein H, Calderon TM, Berman JW

CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 mediates enhanced transmigration of human immunodeficiency virus (HIV)-infected leukocytes across the blood-brain barrier: a potential mechanism of HIV-CNS invasion and NeuroAIDS
J Neurosci. 2006 Jan 25;26(4):1098-106

Ewart GD, Howells AJ

ABC transporters involved in transport of eye pigment precursors in *Drosophila melanogaster*
Methods Enzymol. 1998;292:213-24

F

Fantini J, Yahi N, Chermann JC

Human immunodeficiency virus can infect the apical and basolateral surfaces of human colonic epithelial cells
Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Oct 15;88(20):9297-301

Feller N, Broxterman HJ, Währer DC, Pinedo HM

ATP-dependent efflux of calcein by the multidrug resistance protein (MRP): no inhibition by intracellular glutathione depletion
FEBS Lett. 1995 Jul 17;368(2):385-8

Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA

HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor
Science. 1996 May 10;272(5263):872-7

Ferneti C, Pascolo L, Podda E, Gennaro R, Stebel M, Tiribelli C.

Preparation of an antibody recognizing both human and rodent MRP1
Biochem Biophys Res Commun. 2001 Nov 9;288(4):1064-8

Finzi D, Siliciano RF.

Viral dynamics in HIV-1 infection
Cell. 1998 May 29;93(5):665-71

Flens MJ, Izquierdo MA, Scheffer GL, Fritz JM, Meijer CJ, Scheper RJ, Zaman GJ

Immunochemical detection of the multidrug resistance-associated protein MRP in human multidrug-resistant tumor cells by monoclonal antibodies
Cancer Res. 1994 Sep 1;54(17):4557-63.

Flens MJ, Zaman GJ, van der Valk P, Izquierdo MA, Schroeijers AB, Scheffer GL, van der Groep P, de Haas M, Meijer CJ, Scheper RJ

Tissue distribution of the multidrug resistance protein
Am J Pathol. 1996 Apr;148(4):1237-47

Fojo A, Lebo R, Shimizu N, Chin JE, Roninson IB, Merlino GT, Gottesman MM, Pastan I

Localization of multidrug resistance-associated DNA sequences to human chromosome 7
Somat Cell Mol Genet. 1986 Jul;12(4):415-20

Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I

Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues
Proc Natl Acad Sci U S A. 1987, 84(1):265-9

Folks TM, Justement J, Kinter A, Dinarello CA, Fauci AS

Cytokine-induced expression of HIV-1 in a chronically infected promonocyte cell line
Science. 1987 Nov 6;238(4828):800-2

Folks TM, Kessler SW, Orenstein JM, Justement JS, Jaffe ES, Fauci AS

Infection and replication of HIV-1 in purified progenitor cells of normal human bone marrow
Science. 1988 Nov 11;242(4880):919-22

Ford J, Boffito M, Maitland D, Hill A, Back D, Khoo S, Nelson M, Moyle G, Gazzard B, Pozniak A

Influence of atazanavir 200 mg on the intracellular and plasma pharmacokinetics of saquinavir and ritonavir 1600/100 mg administered once daily in HIV-infected patients
J Antimicrob Chemother. 2006 Nov;58(5):1009-16

Ford J, Meaden ER, Hoggard PG, Dalton M, Newton P, Williams I, Khoo SH, Back DJ

Effect of protease inhibitor-containing regimens on lymphocyte multidrug resistance transporter expression
J Antimicrob Chemother. 2003 Sep;52(3):354-8

Freed EO

HIV-1 replication
Somat Cell Mol Genet. 2001, 26(1-6):13-33

Frick LW, St John L, Taylor LC, Painter GR, Furman PA, Liotta DC, Furfine ES, Nelson DJ

Pharmacokinetics, oral bioavailability, and metabolic disposition in rats of (-)-cis-5-fluoro-1-[2-(hydroxymethyl)-1,3-oxathiolan-5-yl] cytosine, a nucleoside analog active against human immunodeficiency virus and hepatitis B virus
Antimicrob Agents Chemother. 1993 Nov;37(11):2285-92

Fukushima Y, Oshika Y, Tokunaga T, Hatanaka H, Tomisawa M, Kawai K, Ozeki Y, Tsuchida T, Kijima H, Yamazaki H, Ueyama Y, Tamaoki N, Miura S, Nakamura M

Multidrug resistance-associated protein (MRP) expression is correlated with expression of aberrant p53 protein in colorectal cancer
Eur J Cancer. 1999 Jun;35(6):935-8

Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S

Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions
J Cell Biol. 1993 Dec;123(6 Pt 2):1777-88

G

Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, Mann D, Sidhu GD, Stahl RE, Zolla-Pazner S, Leibowitch J, Popovic M.

Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)
Science. 1983, 220(4599):865-7

Gao HQ, Boyer PL, Sarafianos SG, Arnold E, Hughes SH

The role of steric hindrance in 3TC resistance of human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase
J Mol Biol. 2000 Jul 7;300(2):403-18

Gartner S

HIV infection and dementia
Science. 2000 Jan 28;287(5453):602-4

Gatti G, Pontali E, Boni S, De Pascalis CR, Bassetti M, Bassetti D

The relationship between ritonavir plasma trough concentration and virological and immunological response in HIV-infected children
HIV Med. 2002 Apr;3(2):125-8

Gekeler V, Ise W, Sanders KH, Ulrich WR, Beck J

The leukotriene LTD4 receptor antagonist MK571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance
Biochem Biophys Res Commun. 1995 Mar 8;208(1):345-52

Gendelman HE, Narayan O, Molineaux S, Clements JE, Ghotbi Z.

Slow, persistent replication of lentiviruses: role of tissue macrophages and macrophage precursors in bone marrow
Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 Oct;82(20):7086-90

Georgsson G

Neuropathologic aspects of lentiviral infections
Ann N Y Acad Sci. 1994 Jun 6;724:50-67

Gerloff T

Impact of genetic polymorphisms in transmembrane carrier-systems on drug and xenobiotic distribution
Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 2004 Jan;369(1):69-77

Ghorpade A, Xia MQ, Hyman BT, Persidsky Y, Nukuna A, Bock P, Che M, Limoges J, Gendelman HE, Mackay CR

Role of the beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 in human immunodeficiency virus type 1 infection of monocytes and microglia
J Virol. 1998 Apr;72(4):3351-61

Gibbs JE, Gaffen Z, Thomas SA

Nevirapine uptake into the central nervous system of the Guinea pig: an in situ brain perfusion study
J Pharmacol Exp Ther. 2006 May;317(2):746-51

Gibbs JE, Rashid T, Thomas SA

Effect of transport inhibitors and additional anti-HIV drugs on the movement of lamivudine (3TC) across the guinea pig brain barriers
J Pharmacol Exp Ther. 2003 Sep;306(3):1035-41

Gibbs JE, Thomas SA

The distribution of the anti-HIV drug, 2',3'-dideoxycytidine (ddC), across the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers and the influence of organic anion transport inhibitors
J Neurochem. 2002 Feb;80(3):392-404

Glynn SL, Yazdanian M

In vitro blood-brain barrier permeability of nevirapine compared to other HIV antiretroviral agents
J Pharm Sci. 1998 Mar;87(3):306-10

Golden PL, Pollack GM

Blood-brain barrier efflux transport
J Pharm Sci. 2003 Sep;92(9):1739-53

Goldsmith ME, Madden MJ, Morrow CS, Cowan KH

A Y-box consensus sequence is required for basal expression of the human multidrug resistance (mdr1) gene
J Biol Chem. 1993 Mar 15;268(8):5856-60

Goldsmith DR, Perry CM

Atazanavir
Drugs. 2003;63(16):1679-93

Goldstein GW, Betz AL

Recent advances in understanding brain capillary function
Ann Neurol. 1983 Oct;14(4):389-95

Gollapudi S, Gupta S

Human immunodeficiency virus I-induced expression of P-glycoprotein
Biochem Biophys Res Commun. 1990 Sep 28;171(3):1002-7

Gong YF, Robinson BS, Rose RE, Deminie C, Spicer TP, Stock D, Colonno RJ, Lin PF

In vitro resistance profile of the human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor BMS-232632
Antimicrob Agents Chemother. 2000 Sep;44(9):2319-26

Gottesman MM, Cardarelli C, Goldenberg S, Licht T, Pastan I

Selection and maintenance of multidrug-resistant cells
Methods Enzymol. 1998; 292:248-58

Grant GA, Abbott NJ, Janigro D

Understanding the Physiology of the Blood-Brain Barrier: In Vitro Models
News Physiol Sci. 1998 Dec;13:287-293

Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P, Kreichgauer HP, von Richter O, Zundler J, Kroemer HK

The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin
J Clin Invest. 1999 Jul;104(2):147-53

Groothuis DR, Levy RM

The entry of antiviral and antiretroviral drugs into the central nervous system
J Neurovirol. 1997 Dec;3(6):387-400

Gupta S, Gollapudi S

P-glycoprotein (MDR 1 gene product) in cells of the immune system: its possible physiologic role and alteration in aging and human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infection
J Clin Immunol. 1993; 13(5):289-301

Gupta A, Zhang Y, Unadkat JD, Mao Q

HIV protease inhibitors are inhibitors but not substrates of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)
J Pharmacol Exp Ther. 2004 Jul;310(1):334-41

Gutiérrez F, Padilla S, Masiá M, Navarro A, Gallego J, Hernández I, Ramos JM, Martín-Hidalgo A

Changes in body fat composition after 1 year of salvage therapy with lopinavir/ritonavir-containing regimens and its relationship with lopinavir plasma concentrations
Antivir Ther. 2004 Feb;9(1):105-13

Gutiérrez F, Padilla S, Navarro A, Masiá M, Hernández I, Ramos J, Esteban A, Martín-Hidalgo A
Lopinavir plasma concentrations and changes in lipid levels during salvage therapy with lopinavir/ritonavir-containing regimens
J Acquir Immune Defic Syndr. 2003 Aug 15;33(5):594-600

H

Haimeur A, Conseil G, Deeley RG, Cole SP
The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation
Curr Drug Metab. 2004 Feb;5(1):21-53

Hanly A, Petit CK
HLA-DR-positive dendritic cells of the normal human choroid plexus: a potential reservoir of HIV in the central nervous system
Hum Pathol. 1998 Jan;29(1):88-93

Harouse JM, Bhat S, Spitalnik SL, Laughlin M, Stefano K, Silberberg DH, Gonzalez-Scarano F
Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide
Science. 1991 Jul 19;253(5017):320-3

Hasegawa T, Juni K, Saneyoshi M, Kawaguchi T
Intestinal absorption and first-pass elimination of 2', 3'-dideoxynucleosides following oral administration in rats
Biol Pharm Bull. 1996 Apr;19(4):599-603

Hawkins RA, O'Kane RL, Simpson IA, Viña JR
Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids
J Nutr. 2006 Jan;136(1 Suppl):218S-26S

Hayashi A, Suzuki H, Itoh K, Yamamoto M, Sugiyama Y
Transcription factor Nrf2 is required for the constitutive and inducible expression of multidrug resistance-associated protein 1 in mouse embryo fibroblasts
Biochem Biophys Res Commun. 2003 Oct 24;310(3):824-9

Hazen R, Harvey R, Ferris R, Craig C, Yates P, Griffin P, Miller J, Kaldor I, Ray J, Samano V, Furfine E, Spaltenstein A, Hale M, Tung R, St Clair M, Hanlon M, Boone L
In vitro antiviral activity of the novel, tyrosyl-based human immunodeficiency virus (HIV) type 1 protease inhibitor brexnavir (GW640385) in combination with other antiretrovirals and against a panel of protease inhibitor-resistant HIV
Antimicrob Agents Chemother. 2007 Sep;51(9):3147-54

Henderson LE, Sowder R, Copeland TD, Oroszlan S, Arthur LO, Robey WG, Fischinger PJ
Direct identification of class II histocompatibility DR proteins in preparations of human T-cell lymphotropic virus type III
J Virol. 1987, 61(2):629-32

Higgins CF
ABC transporters: from microorganisms to man
Annu Rev Cell Biol. 1992;8:67-113

Higgins CF
ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview
Res Microbiol. 2001 Apr-May;152(3-4):205-10

Higgins CF, Hiles ID, Salmond GP, Gill DR, Downie JA, Evans IJ, Holland IB, Gray L, Buckel SD, Bell AW, et al

A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria.
Nature. 1986 Oct 2-8;323(6087):448-50

Higgins CF, Linton KJ

Structural biology. The xyz of ABC transporters
Science. 2001 Sep 7;293(5536):1782-4

Higgins CF, Linton KJ

The ATP switch model for ABC transporters
Nat Struct Mol Biol. 2004 Oct;11(10):918-26

Hipfner DR, Gauldie SD, Deeley RG, Cole SP

Detection of the M(r) 190,000 multidrug resistance protein, MRP, with monoclonal antibodies
Cancer Res. 1994 Nov 15;54(22):5788-92

Hirase T, Staddon JM, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S, Rubin LL

Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells
J Cell Sci. 1997 Jul;110 (Pt 14):1603-13

Hirsch MS, Brun-Vezinet F, Clotet B

Antiretroviral drug resistance testing in adults infected with human immunodeficiency virus type 1: 2003 recommendations of an International AIDS Society-USA panel
Clin Infect Dis. 2003; 37 : 113-128

Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U

Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo
Proc Natl Acad Sci U S A. 2000; 97(7):3473-8

Hofmann W, Reichart B, Ewald A, Muller E, Schmitt I, Stauber RH, Lottspeich F, Jockusch BM, Scheer U, Hauber J, Dabauvalle MC.

Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE)- and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin
J Cell Biol. 2001; 152(5):895-910

Holló Z, Homolya L, Hegedüs T, Sarkadi B

Transport properties of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in human tumour cells
FEBS Lett. 1996 Mar 25;383(1-2):99-104

Homolya L, Váradi A, Sarkadi B

Multidrug resistance-associated proteins: Export pumps for conjugates with glutathione, glucuronate or sulfate
Biofactors. 2003;17(1-4):103-14

Hrycyna CA, Airan LE, Germann UA, Ambudkar SV, Pastan I, Gottesman MM

Structural flexibility of the linker region of human P-glycoprotein permits ATP hydrolysis and drug transport
Biochemistry. 1998 Sep 29;37(39):13660-73

Huber JD, Egleton RD, Davis TP

Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier
Trends Neurosci. 2001 Dec;24(12):719-25

Huang Y, Paxton WA, Wolinsky SM, Neumann AU, Zhang L, He T, Kang S, Ceradini D, Jin Z, Yazdanbakhsh K, Kunstman K, Erickson D, Dragon E, Landau NR, Phair J, Ho DD, Koup RA

The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression
Nat Med. 1996 Nov;2(11):1240-3

Huang L, Wring SA, Woolley JL, Brouwer KR, Serabjit-Singh C, Polli JW
Induction of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A by HIV protease inhibitors
Drug Metab Dispos. 2001 May;29(5):754-60

Huisman MT, Smit JW, Crommentuyn KM, Zelcer N, Wiltshire HR, Beijnen JH, Schinkel AH
Multidrug resistance protein 2 (MRP2) transports HIV protease inhibitors, and transport can be enhanced by other drugs
AIDS. 2002 Nov 22;16(17):2295-301

Huisman MT, Smit JW, Wiltshire HR, Hoetelmans RM, Beijnen JH, Schinkel AH
P-glycoprotein limits oral availability, brain, and fetal penetration of saquinavir even with high doses of ritonavir
Mol Pharmacol. 2001 Apr;59(4):806-13

Hulgan T, Donahue JP, Hawkins C, Unutmaz D, D'Aquila RT, Raffanti S, Nicotera F, Rebeiro P, Erdem H, Rueff M, Haas DW
Implications of T-cell P-glycoprotein activity during HIV-1 infection and its therapy
J Acquir Immune Defic Syndr. 2003 Oct 1;34(2):119-26.

Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, Higgins CF
Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport
Nature. 1990 Jul 26;346(6282):362-5

I

Imai Y, Ishikawa E, Asada S, Sugimoto Y
Estrogen-mediated post transcriptional down-regulation of breast cancer resistance protein/ABCG2
Cancer Res. 2005 Jan 15;65(2):596-604

Imami N, Hardy G, Pires A, Burton C, Pido-Lopez J, Mela C, Gotch F
Immune reconstitution in HIV-1-infected patients
Curr Opin Investig Drugs. 2002 Aug;3(8):1138-45

Ito K, Suzuki H, Hirohashi T, Kume K, Shimizu T, Sugiyama Y
Molecular cloning of canalicular multispecific organic anion transporter defective in EHBR
Am J Physiol. 1997 Jan;272(1 Pt 1):G16-22

Ito K, Suzuki H, Horie T, Sugiyama Y
Apical/basolateral surface expression of drug transporters and its role in vectorial drug transport.
Pharm Res. 2005 Oct;22(10):1559-77

Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S
Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins
J Cell Biol. 1999 Dec 13;147(6):1351-63

J

Jacobson JM, Israel RJ, Lowy I, Ostrow NA, Vassilatos LS, Barish M, Tran DN, Sullivan BM, Ketas TJ, O'Neill TJ, Nagashima KA, Huang W, Petropoulos CJ, Moore JP, Maddon PJ, Olson WC
Treatment of advanced human immunodeficiency virus type 1 disease with the viral entry inhibitor PRO 542
Antimicrob Agents Chemother. 2004 Feb;48(2):423-9

Jacobson JM, Lowy I, Fletcher CV, O'Neill TJ, Tran DN, Ketas TJ, Trkola A, Klotman ME, Maddon PJ, Olson WC, Israel RJ

Single-dose safety, pharmacology, and antiviral activity of the human immunodeficiency virus (HIV) type 1 entry inhibitor PRO 542 in HIV-infected adults
J Infect Dis. 2000 Jul;182(1):326-9

James JS

T-20 and Trimeris

AIDS Treat News. 1998 Apr 17;(No 293):1-6

Jamjoom GA

Protease inhibitors as potential therapeutic agents for AIDS

Ann Saudi Med. 1991 Sep;11(5):568-75

Janneh O, Jones E, Chandler B, Owen A, Khoo SH

Inhibition of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins modulates the intracellular concentration of lopinavir in cultured CD4 T cells and primary human lymphocytes

J Antimicrob Chemother. 2007 Nov;60(5):987-93

Janneh O, Owen A, Chandler B, Hartkoorn RC, Hart CA, Bray PG, Ward SA, Back DJ, Khoo SH

Modulation of the intracellular accumulation of saquinavir in peripheral blood mononuclear cells by inhibitors of MRP1, MRP2, P-gp and BCRP

AIDS. 2005 Dec 2;19(18):2097-102

Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Center M, Keppler D

ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance-associated protein

Cancer Res. 1994 Sep 15;54(18):4833-6

Jenwitheesuk E, Samudrala R

Heptad-repeat-2 mutations enhance the stability of the enfuvirtide-resistant HIV-1 gp41 hairpin structure

Antivir Ther. 2005;10(8):893-900

Jette L, Beaulieu E, Leclerc JM, Beliveau R

Cyclosporin A treatment induces overexpression of P-glycoprotein in the kidney and other tissues

Am J Physiol. 1996 May;270(5 Pt 2):F756-65

Jiang Q, Matsuzaki Y, Li K, Uitto J

Transcriptional regulation and characterization of the promoter region of the human ABCC6 gene

J Invest Dermatol. 2006 Feb;126(2):325-35

Jin S, Scotto KW

Transcriptional regulation of the MDR1 gene by histone acetyltransferase and deacetylase is mediated by NF-Y

Mol Cell Biol. 1998 Jul;18(7):4377-84

Jin W, Scotto KW, Hait WN, Yang JM

Involvement of CtBP1 in the transcriptional activation of the MDR1 gene in human multidrug resistant cancer cells

Biochem Pharmacol. 2007 Sep 15;74(6):851-9

Johnson MD, Anderson BD

Use of cultured cerebral capillary endothelial cells in modeling the central nervous system availability of 2',3'-dideoxyinosine

J Pharm Sci. 2000 Mar;89(3):322-35

Johnson MA, Gathe JC Jr, Podzamczek D, Molina JM, Naylor CT, Chiu YL, King MS, Podsadecki TJ, Hanna GJ, Brun SC

A once-daily lopinavir/ritonavir-based regimen provides noninferior antiviral activity compared with a twice-daily regimen

J Acquir Immune Defic Syndr. 2006 Oct 1;43(2):153-60

Jones K, Bray PG, Khoo SH, Davey RA, Meaden ER, Ward SA, Back DJ (a)

P-Glycoprotein and transporter MRP1 reduce HIV protease inhibitor uptake in CD4 cells: potential for accelerated viral drug resistance?

AIDS. 2001 Jul 27;15(11):1353-8

Jones K, Hoggard PG, Khoo S, Maher B, Back DJ (b)

Effect of alpha1-acid glycoprotein on the intracellular accumulation of the HIV protease inhibitors saquinavir, ritonavir and indinavir in vitro

Br J Clin Pharmacol. 2001 Jan;51(1):99-102

Jones K, Hoggard PG, Sales SD, Khoo S, Davey R, Back DJ (c)

Differences in the intracellular accumulation of HIV protease inhibitors in vitro and the effect of active transport

AIDS. 2001 Apr 13;15(6):675-81

Jonker JW, Buitelaar M, Wagenaar E, Van Der Valk MA, Scheffer GL, Scheper RJ, Plosch T, Kuipers F, Elferink RP, Rosing H, Beijnen JH, Schinkel AH

The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria

Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Nov 26;99(24):15649-54

Jorajuria S, Clayette P, Dereuddre-Bosquet N, Benlhassan-Chahour K, Thiébot H, Vaslin B, Le Grand R, Dormont D

The expression of P-glycoprotein and cellular kinases is modulated at the transcriptional level by infection and highly active antiretroviral therapy in a primate model of AIDS

AIDS Res Hum Retroviruses. 2003 Apr;19(4):307-11

Jorajuria S, Dereuddre-Bosquet N, Becher F, Martin S, Porcheray F, Garrigues A, Mabondzo A, Benech H, Grassi J, Orlowski S, Dormont D, Clayette P (a)

ATP binding cassette multidrug transporters limit the anti-HIV activity of zidovudine and indinavir in infected human macrophages

Antivir Ther. 2004 Aug;9(4):519-28

Jorajuria S, Dereuddre-Bosquet N, Naissant-Storck K, Dormont D, Clayette P (b)

Differential expression levels of MRP1, MRP4, and MRP5 in response to human immunodeficiency virus infection in human macrophages

Antimicrob Agents Chemother. 2004 May;48(5):1889-91

Josserand V, Pélerin H, de Bruin B, Jegu B, Kuhnast B, Hinnen F, Ducongé F, Boisgard R, Beuvon F, Chassoux F, Dumas-Duport C, Ezan E, Dollé F, Mabondzo A, Tavitian B

Evaluation of drug penetration into the brain: a double study by in vivo imaging with positron emission tomography and using an in vitro model of the human blood-brain barrier

J Pharmacol Exp Ther. 2006 Jan;316(1):79-86

K

Kage K, Tsukahara S, Sugiyama T, Asada S, Ishikawa E, Tsuruo T, Sugimoto Y

Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization

Int J Cancer. 2002 Feb 10;97(5):626-30

Kanmogne GD, Primeaux C, Grammas P

HIV-1 gp120 proteins alter tight junction protein expression and brain endothelial cell permeability: implications for the pathogenesis of HIV-associated dementia.

J Neuropathol Exp Neurol. 2005 Jun;64(6):498-505

Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, Tontonoz P, Kliewer S, Willson TM, Edwards PA

Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor
J Biol Chem. 2002 Jan 25;277(4):2908-15

Katlama C, Carcelain G, Duvivier C.

Interleukin-2 accelerates CD4 cell reconstitution in HIV-infected patients with severe immunosuppression despite highly active antiretroviral therapy: the ILSTIM study-ANRS 082
AIDS. 2002, 16: 2027-2034

Kauffmann HM, Pfannschmidt S, Zöller H, Benz A, Vorderstemann B, Webster JI, Schrenk D

Influence of redox-active compounds and PXR-activators on human MRP1 and MRP2 gene expression
Toxicology. 2002 Feb 28;171(2-3):137-46

Kaul M, Garden GA, Lipton SA

Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia
Nature. 2001 Apr 19;410(6831):988-94

Kearney BP, Flaherty JF, Shah J

Tenofovir disoproxil fumarate: clinical pharmacology and pharmacokinetics
Clin Pharmacokinet. 2004;43(9):595-612

Kempf DJ, King MS, Berstein B

Incidence of resistance in a doubleblind study comparing lopinavir/ritonavir plus stavudine and lamivudine to nelfinavir plus stavudine and lamivudine
J Infect Dis. 2004, 189: 51-60

Kempf DJ, Marsh KC, Kumar G, Rodrigues AD, Denissen JF, McDonald E, Kukulka MJ, Hsu A, Granneman GR, Baroldi PA, Sun E, Pizzuti D, Plattner JJ, Norbeck DW, Leonard JM

Pharmacokinetic enhancement of inhibitors of the human immunodeficiency virus protease by coadministration with ritonavir
Antimicrob Agents Chemother. 1997 Mar;41(3):654-60

Keppler D, Kartenbeck J

The canalicular conjugate export pump encoded by the cmrp/cmoat gene
Prog Liver Dis. 1996;14:55-67

Keppler D, Jedlitschky G, Leier I

Transport function and substrate specificity of multidrug resistance protein
Methods Enzymol. 1998;292:607-16

Kerb R

Implications of genetic polymorphisms in drug transporters for pharmacotherapy
Cancer Lett. 2006 Mar 8;234(1):4-33

Ketas TJ, Kuhmann SE, Palmer A, Zurita J, He W, Ahuja SK, Klasse PJ, Moore JP

Cell surface expression of CCR5 and other host factors influence the inhibition of HIV-1 infection of human lymphocytes by CCR5 ligands
Virology. 2007 Aug 1;364(2):281-90

Khoo SH, Hoggard PG, Williams I, Meaden ER, Newton P, Wilkins EG, Smith A, Tjia JF, Lloyd J, Jones K, Beeching N, Carey P, Peters B, Back DJ

Intracellular accumulation of human immunodeficiency virus protease inhibitors
Antimicrob Agents Chemother. 2002 Oct;46(10):3228-35

Killingley B, Pozniak A

The first once-daily single-tablet regimen for the treatment of HIV-infected patients
Drugs Today (Barc). 2007 Jul;43(7):427-42

Kim RB, Fromm MF, Wandel C, Leake B, Wood AJ, Roden DM, Wilkinson GR

The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors
J Clin Invest. 1998 Jan 15;101(2):289-94

Kim JH, Kim JH, Park JA, Lee SW, Kim WJ, Yu YS, Kim KW

Blood-neural barrier: intercellular communication at glio-vascular interface
J Biochem Mol Biol. 2006 Jul 31;39(4):339-45

Kim SH, Lee SH, Kwak NH, Kang CD, Chung BS

Effect of the activated Raf protein kinase on the human multidrug resistance 1 (MDR1) gene promoter
Cancer Lett. 1996 Jan 2;98(2):199-205

Kitai R, Zhao ML, Zhang N, Hua LL, Lee SC

Role of MIP-1beta and RANTES in HIV-1 infection of microglia: inhibition of infection and induction by IFNbeta
J Neuroimmunol. 2000 Oct 2;110(1-2):230-9

Kiuchi Y, Suzuki H, Hirohashi T, Tyson CA, Sugiyama Y

cDNA cloning and inducible expression of human multidrug resistance associated protein 3 (MRP3)
FEBS Lett. 1998 Aug 14;433(1-2):149-52

Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruet J, Guetard D, Hercend T, Gluckman JC, Montagnier L

T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV
Nature. 1984, 312(5996):767-8

Klein I, Sarkadi B, Váradi A

An inventory of the human ABC proteins
Biochim Biophys Acta. 1999 Dec 6;1461(2):237-62

Klimecki WT, Futscher BW, Grogan TM, Dalton WS

P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers
Blood. 1994 May 1;83(9):2451-8

Kniesel U, Wolburg H

Tight junctions of the blood-brain barrier
Cell Mol Neurobiol. 2000 Feb;20(1):57-76

König J, Rost D, Cui Y, Keppler D

Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane
Hepatology. 1999 Apr;29(4):1156-63

Kontorinis N, Dieterich DT

Toxicity of non-nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors
Semin Liver Dis. 2003 May;23(2):173-82

Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJ, Juijn JA, Baas F, Borst P

Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines
Cancer Res. 1997 Aug 15;57(16):3537-47

Kool M, van der Linden M, de Haas M, Scheffer GL, de Vree JM, Smith AJ, Jansen G, Peters GJ, Ponne N, Scheper RJ, Elferink RP, Baas F, Borst P

MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs
Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Jun 8;96(12):6914-9

Korber B, Muldoon M, Theiler J, Gao F, Gupta R, Lapedes A, Hahn BH, Wolinsky S, Bhattacharya T.

2000, Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains
Science. 2000, 288(5472):1789-96

Kramer-Hämmerle S, Rothenaigner I, Wolff H, Bell JE, Brack-Werner R

Cells of the central nervous system as targets and reservoirs of the human immunodeficiency virus
Virus Res. 2005 Aug;111(2):194-213

Krishna R, Mayer LD

Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs
Eur J Pharm Sci. 2000 Oct;11(4):265-83

Krishnamurthy P, Schuetz JD

The ABC transporter Abcg2/Bcrp: role in hypoxia mediated survival
Biometals. 2005 Aug;18(4):349-58

Kumar GN, Rodrigues AD, Buko AM, Denissen JF

Cytochrome P450-mediated metabolism of the HIV-1 protease inhibitor ritonavir (ABT-538) in human liver microsomes
J Pharmacol Exp Ther. 1996 Apr;277(1):423-31

Kusuhara H, Sugiyama Y

Efflux transport systems for drugs at the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier (Part 2)
Drug Discov Today. 2001 Feb 1;6(4):206-212

L

Laupèze B, Amiot L, Payen L, Drénou B, Grosset JM, Lehne G, Fauchet R, Fardel O

Multidrug resistance protein (MRP) activity in normal mature leukocytes and CD34-positive hematopoietic cells from peripheral blood
Life Sci. 2001 Feb 2;68(11):1323-31

Lee CG, Gottesman MM, Cardarelli CO, Ramachandra M, Jeang KT, Ambudkar SV, Pastan I, Dey S

HIV-1 protease inhibitors are substrates for the MDR1 multidrug transporter
Biochemistry. 1998 Mar 17;37(11):3594-601

Lee CG, Ramachandra M, Jeang KT, Martin MA, Pastan I, Gottesman MM

Effect of ABC transporters on HIV-1 infection: inhibition of virus production by the MDR1 transporter
FASEB J. 2000 Mar;14(3):516-22

Lee G, Schlichter L, Bendayan M, Bendayan R

Functional expression of P-glycoprotein in rat brain microglia
J Pharmacol Exp Ther. 2001 Oct;299(1):204-12

Legrand O, Simonin G, Perrot JY, Zittoun R, Marie JP

Pgp and MRP activities using calcein-AM are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia patients
Blood. 1998 Jun 15;91(12):4480-8

Leslie EM, Deeley RG, Cole SP

Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense
Toxicol Appl Pharmacol. 2005 May 1;204(3):216-37

Letendre SL, van den Brande G, Hermes A, Woods SP, Durelle J, Beck JM, McCutchan JA, Okamoto C, Ellis RJ; the HIV Neurobehavioral Research Center Group

Lopinavir with Ritonavir Reduces the HIV RNA Level in Cerebrospinal Fluid
Clin Infect Dis. 2007 Oct 19;45(11)

Licht T, Fiebig HH, Bross KJ, Herrmann F, Berger DP, Shoemaker R, Mertelsmann R

Induction of multiple-drug resistance during anti-neoplastic chemotherapy in vitro
Int J Cancer. 1991, 49(4):630-7

Lipton SA, Gendelman HE

Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Dementia associated with the acquired immunodeficiency syndrome
N Engl J Med. 1995 Apr 6;332(14):934-40

Litman T, Druley TE, Stein WD, Bates SE

From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance
Cell Mol Life Sci. 2001 Jun;58(7):931-59

Li XL, Moudgil T, Vinters HV, Ho DD

CD4-independent, productive infection of a neuronal cell line by human immunodeficiency virus type 1
J Virol. 1990 Mar;64(3):1383-7

Limoges J, Persidsky Y, Poluektova L, Rasmussen J, Ratanasuwan W, Zelivyanskaya M, McClernon DR, Lanier ER, Gendelman HE

Evaluation of antiretroviral drug efficacy for HIV-1 encephalitis in SCID mice
Neurology. 2000 Jan 25;54(2):379-89

Liu Y, Liu H, Kim BO, Gattone VH, Li J, Nath A, Blum J, He JJ

CD4-independent infection of astrocytes by human immunodeficiency virus type 1: requirement for the human mannose receptor
J Virol. 2004 Apr;78(8):4120-33

Liu NQ, Lossinsky AS, Popik W, Li X, Gujuluva C, Kriederman B, Roberts J, Pushkarsky T, Bukrinsky M, Witte M, Weinand M, Fiala M

Human immunodeficiency virus type 1 enters brain microvascular endothelia by macropinocytosis dependent on lipid rafts and the mitogen-activated protein kinase signaling pathway
J Virol. 2002 Jul;76(13):6689-700

Loe DW, Almquist KC, Cole SP, Deeley RG

ATP-dependent 17 beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide) transport by multidrug resistance protein (MRP). Inhibition by cholestatic steroids
J Biol Chem. 1996 Apr 19;271(16):9683-9

Löscher W, Potschka H (a)

Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters
Nat Rev Neurosci. 2005 Aug;6(8):591-602

Löscher W, Potschka H (b)

Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases
Prog Neurobiol. 2005 May;76(1):22-76

Louwagie J, McCutchan FE, Peeters M, Brennan TP, Sanders-Buell E, Eddy GA, van der Groen G, Fransen K, Gershy-Damet GM, Deleys R

Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes
AIDS. 1993, 7(6):769-80

Lucia MB, Cauda R, Landay AL, Malorni W, Donelli G, Ortona L (a)

Transmembrane P-glycoprotein (P-gp/P-170) in HIV infection: analysis of lymphocyte surface expression and drug-unrelated function
AIDS Res Hum Retroviruses. 1995 Aug;11(8):893-901

Lucia MB, Cauda R, Malorni W, Rainaldi G, Tumbarello M, Tacconelli E, Rumi C, Donelli G, Ortona L (b)

P-170 glycoprotein (P-170) is involved in the impairment of natural killer cell-mediated cytotoxicity in HIV+ patients
Immunol Lett. 1995 Sep;47(3):223-6

Lucia MB, Golotta C, Rutella S, Rastrelli E, Savarino A, Cauda R

Atazanavir inhibits P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein efflux activity
J Acquir Immune Defic Syndr. 2005 Aug 15;39(5):635-7

Lucia MB, Rutella S, Leone G, Larocca LM, Vella S, Cauda R

In vitro and in vivo modulation of MDR1/P-glycoprotein in HIV-infected patients administered highly active antiretroviral therapy and liposomal doxorubicin
J Acquir Immune Defic Syndr. 2002 Aug 1;30(4):369-78

M

Maddon PJ, Dalglish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R.

The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain
Cell. 1986, 47(3):333-48

Magnarin M, Morelli M, Rosati A, Bartoli F, Candussio L, Giraldi T, Decorti G

Induction of proteins involved in multidrug resistance (P-glycoprotein, MRP1, MRP2, LRP) and of CYP 3A4 by rifampicin in LLC-PK1 cells
Eur J Pharmacol. 2004 Jan 1;483(1):19-28

Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, van De Vijver MJ, Scheper RJ, Schellens JH

Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues
Cancer Res. 2001 Apr 15;61(8):3458-64

Malkovský M, Philpott K, Dalglish AG, Mellor AL, Patterson S, Webster AD, Edwards AJ, Maddon PJ

Infection of B lymphocytes by the human immunodeficiency virus and their susceptibility to cytotoxic cells
Eur J Immunol. 1988 Sep;18(9):1315-21

Marcelin AG, Molina JM, Gaudichet A.

Clinically relevant interpretation of genotype for resistance to didanosine in treatment experienced HIV infected patients.
9th European AIDS Conference, Warsaw, 2003, abstract F6/9

Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E

Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration
J Cell Biol. 1998 Jul 13;142(1):117-27

Marzolini C, Telenti A, Decosterd LA, Greub G, Biollaz J, Buclin T

Efavirenz plasma levels can predict treatment failure and central nervous system side effects in HIV-1-infected patients
AIDS. 2001 Jan 5;15(1):71-5

Masur H, Michelis MA, Greene JB, Onorato I, Stouwe RA, Holzman RS, Wormser G, Brettman L, Lange M, Murray HW, Cunningham-Rundles S.

An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction
N Engl J Med. 1981, 305(24):1431-8

Matsumura T, Wolff K, Petzelbauer P

Endothelial cell tube formation depends on cadherin 5 and CD31 interactions with filamentous actin
J Immunol. 1997 Apr 1;158(7):3408-16

Matter K, Balda MS

Signalling to and from tight junctions
Nat Rev Mol Cell Biol. 2003 Mar;4(3):225-36

McCrea PD, Turck CW, Gumbiner B

A homolog of the armadillo protein in *Drosophila* (plakoglobin) associated with E-cadherin
Science. 1991 Nov 29;254(5036):1359-61

McDowell JA, Chittick GE, Ravitch JR, Polk RE, Kerkering TM, Stein DS

Pharmacokinetics of [(14)C]abacavir, a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase inhibitor, administered in a single oral dose to HIV-1-infected adults: a mass balance study
Antimicrob Agents Chemother. 1999 Dec;43(12):2855-61

Meaden ER, Hoggard PG, Maher B, Khoo SH, Back DJ

Expression of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein in healthy volunteers and HIV-infected patients
AIDS Res Hum Retroviruses. 2001 Sep 20;17(14):1329-32

Meaden ER, Hoggard PG, Khoo SH, Back DJ.

Determination of P-gp and MRP1 expression and function in peripheral blood mononuclear cells in vivo
J Immunol Methods. 2002 Apr 1;262(1-2):159-65

Megard I, Garrigues A, Orlowski S, Jorajuria S, Clayette P, Ezan E, Mabondzo A

A co-culture-based model of human blood-brain barrier: application to active transport of indinavir and in vivo-in vitro correlation
Brain Res. 2002 Feb 15;927(2):153-67

Meltzer MS, Gendelman HE.

Mononuclear phagocytes as targets, tissue reservoirs, and immunoregulatory cells in human immunodeficiency virus disease
Curr Top Microbiol Immunol. 1992;181:239-63

Menendez-Arias L

Targeting HIV: antiretroviral therapy and development of drug resistance
Trends Pharmacol Sci. 2002, 23(8):381-8

Ménez C, Buyse M, Besnard M, Farinotti R, Loiseau PM, Barratt G

Interaction between miltefosine and amphotericin B: consequences for their activities towards intestinal epithelial cells and *Leishmania donovani* promastigotes in vitro
Antimicrob Agents Chemother. 2006 Nov;50(11):3793-800

Meyer zu Schwabedissen HE, Grube M, Dreisbach A, Jedlitschky G, Meissner K, Linnemann K, Fusch C, Ritter CA, Völker U, Kroemer HK

Epidermal growth factor-mediated activation of the map kinase cascade results in altered expression and function of ABCG2 (BCRP)
Drug Metab Dispos. 2006 Apr;34(4):524-33

Miller DW

Immunobiology of the blood-brain barrier
J Neurovirol. 1999 Dec;5(6):570-8

Miller MD, Margot N, Lu B.

Genotypic and phenotypic predictors of the magnitude of response to tenofovir disoproxil fumarate treatment in antiretroviral-experienced patients
J Infect Dis. 2004, 189: 837-846

Miller DS, Nobmann SN, Gutmann H, Toeroek M, Drewe J, Fricker G

Xenobiotic transport across isolated brain microvessels studied by confocal microscopy
Mol Pharmacol. 2000 Dec;58(6):1357-67

Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, Brangi M, Greenberger L, Dean M, Fojo T, Bates SE

Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes
Cancer Res. 1999 Jan 1;59(1):8-13

Mo H, Parkin N, Stewart KD, Lu L, Dekhtyar T, Kempf DJ, Molla A

Identification and structural characterization of I84C and I84A mutations that are associated with high-level resistance to human immunodeficiency virus protease inhibitors and impair viral replication
Antimicrob Agents Chemother. 2007 Feb;51(2):732-5

Molina JM, Peytavin G, Perusat S, Lascoux-Combes C, Sereni D, Rozenbaum W, Chene G

Pharmacokinetics of emtricitabine, didanosine and efavirenz administered once-daily for the treatment of HIV-infected adults (pharmacokinetic substudy of the ANRS 091 trial)
HIV Med. 2004 Mar;5(2):99-104

Moore KH, Raasch RH, Brouwer KL, Opheim K, Cheeseman SH, Eyster E, Lemon SM, van der Horst CM

Pharmacokinetics and bioavailability of zidovudine and its glucuronidated metabolite in patients with human immunodeficiency virus infection and hepatic disease (AIDS Clinical Trials Group protocol 062)
Antimicrob Agents Chemother. 1995 Dec;39(12):2732-7

Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S

Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells.
J Cell Biol. 1999 Oct 4;147(1):185-94

Moura MD, Senna MI, Madureira DF, Fonseca LM, Mesquita RA

Oral adverse effects due to the use of Nevirapine
J Contemp Dent Pract. 2008 Jan 1;9(1):84-90

Mouroux M, Izopet J, Descamps D, Delaugerre C, Yvon-Groussin A, Angleraud F, Coutellier A, Bonmarchand M, Valantin MA, Matheron S, Agut H, Katlama C, Brun-Vezinet F, Calvez V

Conditions of "thymidine analog mutations" (TAMs) in naive patients treated with different combinations of d4T
Pathol Biol (Paris). 2000 Jun;48(5):508-12

Moyle GJ, Back D

Principles and practice of HIV-protease inhibitor pharmacoenhancement
HIV Med. 2001 Apr;2(2):105-13

Müller M

Transcriptional control of hepatocanalicular transporter gene expression
Semin Liver Dis. 2000;20(3):323-37

Müller M, Meijer C, Zaman GJ, Borst P, Scheper RJ, Mulder NH, de Vries EG, Jansen PL

Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport
Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Dec 20;91(26):13033-7

Muredda M, Nunoya K, Burtch-Wright RA, Kurz EU, Cole SP, Deeley RG

Cloning and Characterization of the Murine and Rat mrp1 Promoter Regions
Mol Pharmacol. 2003 Nov;64(5):1259-69

Musey L, Hughes J, Schacker T, Shea T, Corey L, McElrath MJ

Cytotoxic-T-cell responses, viral load, and disease progression in early human immunodeficiency virus type 1 infection
N Engl J Med. 1997 Oct 30;337(18):1267-74

Muzammil S, Armstrong AA, Kang LW, Jakalian A, Bonneau PR, Schmelmer V, Amzel LM, Freire E
Unique thermodynamic response of tipranavir to human immunodeficiency virus type 1 protease drug resistance mutations
J Virol. 2007 May;81(10):5144-54

Myers G.

Tenth anniversary perspectives on AIDS. HIV: between past and future
AIDS Res Hum Retroviruses. 1994, 10(11):1317-24

N

Nag S

Morphology and molecular properties of cellular components of normal cerebral vessels
Methods Mol Med. 2003;89:3-36

Nakashima H, Matsui T, Harada S, Kobayashi N, Matsuda A, Ueda T, Yamamoto N

Inhibition of replication and cytopathic effect of human T cell lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus by 3'-azido-3'-deoxythymidine in vitro
Antimicrob Agents Chemother. 1986 Dec;30(6):933-7

Nicolis E, Pasetto M, Cigana C, Pradal U, Assael BM, Melotti P

The GCC repeat length in the 5'UTR of MRP1 gene is polymorphic: a functional characterization of its relevance for cystic fibrosis
BMC Med Genet. 2006 Feb 7;7:7

Nie Z, Bergeron D, Subbramanian RA, Yao XJ, Checroune F, Rougeau N, Cohen EA.

The putative alpha helix 2 of human immunodeficiency virus type 1 Vpr contains a determinant which is responsible for the nuclear translocation of proviral DNA in growth-arrested cells
J Virol. 1998, 72(5):4104-15

Noë A, Plum J, Verhofstede C.

The latent HIV-1 reservoir in patients undergoing HAART: an archive of pre-HAART drug resistance
J Antimicrob Chemother. 2005 Apr;55(4):410-2

Nuovo GJ, Gallery F, MacConnell P, Braun A

In situ detection of polymerase chain reaction-amplified HIV-1 nucleic acids and tumor necrosis factor-alpha RNA in the central nervous system
Am J Pathol. 1994 Apr;144(4):659-66

O

Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B

The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1
Nature. 1996, 384(6606):288

Ohtsuki S, Asaba H, Takanaga H, Deguchi T, Hosoya K, Otagiri M, Terasaki T

Role of blood-brain barrier organic anion transporter 3 (OAT3) in the efflux of indoxyl sulfate, a uremic toxin: its involvement in neurotransmitter metabolite clearance from the brain
J Neurochem. 2002 Oct;83(1):57-66

Olson WC, Maddon PJ

Resistance to HIV-1 entry inhibitors
Curr Drug Targets Infect Disord. 2003 Dec;3(4):283-94

Ostrop NJ, Burgess E, Gill MJ

The use of antiretroviral agents in patients with renal insufficiency
AIDS Patient Care STDS. 1999 Sep;13(9):517-26

Owen A, Khoo SH

Intracellular pharmacokinetics of antiretroviral agents
J HIV Ther. 2004 Nov;9(4):97-101

Ozben T

Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer
FEBS Lett. 2006 May 22;580(12):2903-9

Ozvegy C, Litman T, Szakács G, Nagy Z, Bates S, Váradi A, Sarkadi B

Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells
Biochem Biophys Res Commun. 2001 Jul 6;285(1):111-7

P

Paff MT, Averett DR, Prus KL, Miller WH, Nelson DJ

Intracellular metabolism of (-)- and (+)-cis-5-fluoro-1-[2-(hydroxymethyl)-1,3-oxathiolan-5-yl]cytosine in HepG2 derivative 2.2.15 (subclone P5A) cells
Antimicrob Agents Chemother. 1994 Jun;38(6):1230-8

Paliard X, Lee AY, Walker CM

RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta are not involved in the inhibition of HIV-1SF33 replication mediated by CD8+ T-cell clones
AIDS. 1996 Oct;10(12):1317-21

Pardridge WM, Triguero D, Yang J, Cancilla PA

Comparison of in vitro and in vivo models of drug transcytosis through the blood-brain barrier
J Pharmacol Exp Ther. 1990 May;253(2):884-91

Pardridge WM

Blood-brain barrier genomics and the use of endogenous transporters to cause drug penetration into the brain
Curr Opin Drug Discov Devel. 2003 Sep;6(5):683-91

Park S, Sinko PJ

P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins limit the brain uptake of saquinavir in mice
J Pharmacol Exp Ther. 2005 Mar;312(3):1249-56.

Paterson ARP, and Cass CE

Transport of nucleoside drugs in animal cells
In I. D. Goldman (ed.), Membrane transport of antineoplastic agents. Pergamon Press, Elmsford, N.Y. 1986. p. 309-329

Paterson ARP, Clanachan AS, Craik JD, Gati WP, Jakobs ES, Wiley JS, and Cass CE

Plasma membrane transport of nucleosides, nucleobases, and nucleotides: an overview
In S. Imai and M. Nakazawa (ed.), Role of adenosine and adenine nucleotides in the biological system. Elsevier Science Publishers, BV, Amsterdam. 1991. p. 133-149

Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJ, Bakker CT, Otter M, Scheffer GL, Scheper RJ, Borst P, Oude Elferink RP

Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene
Science. 1996 Feb 23;271(5252):1126-8

Paulusma CC, Kool M, Bosma PJ, Scheffer GL, ter Borg F, Scheper RJ, Tytgat GN, Borst P, Baas F, Oude Elferink RP

A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome
Hepatology. 1997 Jun;25(6):1539-42

Pèlerin H, Compain S, Duval X, Gimenez F, Bénech H, Mabondzo A

Development of an assay method for the detection and quantification of protease and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in plasma and in peripheral blood mononuclear cells by liquid chromatography coupled with ultraviolet or tandem mass spectrometry detection

J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2005 May 5;819(1):47-57

Pellegrin I, Breilh D, Montestruc F, Caumont A, Garrigue I, Morlat P, Le Camus C, Saux MC, Fleury HJ, Pellegrin JL

Virologic response to nelfinavir-based regimens: pharmacokinetics and drug resistance mutations (VIRAPHAR study)

AIDS. 2002 Jul 5;16(10):1331-40

Pellegrin I, Breilh D, Ragnaud JM, Boucher S, Neau D, Fleury H, Schrive MH, Saux MC, Pellegrin JL, Lazaro E, Vray M

Virological responses to atazanavir-ritonavir-based regimens: resistance-substitutions score and pharmacokinetic parameters (Reyaphar study)

Antivir Ther. 2006;11(4):421-9

Perloff ES, Duan SX, Skolnik PR, Greenblatt DJ, von Moltke LL

Atazanavir: effects on P-glycoprotein transport and CYP3A metabolism in vitro

Drug Metab Dispos. 2005 Jun;33(6):764-70

Perloff MD, von Moltke LL, Fahey JM, Daily JP, Greenblatt DJ

Induction of P-glycoprotein expression by HIV protease inhibitors in cell culture

AIDS. 2000 Jun 16;14(9):1287-9

Perloff MD, von Moltke LL, Greenblatt DJ

Ritonavir and dexamethasone induce expression of CYP3A and P-glycoprotein in rats.

Xenobiotica. 2004 Feb;34(2):133-50

Perloff MD, Von Moltke LL, Marchand JE, Greenblatt DJ

Ritonavir induces P-glycoprotein expression, multidrug resistance-associated protein (MRP1) expression, and drug transporter-mediated activity in a human intestinal cell line.

J Pharm Sci. 2001 Nov;90(11):1829-37

Perloff MD, von Moltke LL, Fahey JM, Greenblatt DJ

Induction of P-glycoprotein expression and activity by ritonavir in bovine brain microvessel endothelial cells

J Pharm Pharmacol. 2007 Jul;59(7):947-53

Petty MA, Lo EH

Junctional complexes of the blood-brain barrier: permeability changes in neuroinflammation

Prog Neurobiol. 2002 Dec;68(5):311-23

Peyrière H, Reynes J, Rouanet I, Daniel N, de Boever CM, Mauboussin JM, Leray H, Moachon L, Vincent D, Salmon-Céron D

Renal tubular dysfunction associated with tenofovir therapy: report of 7 cases

J Acquir Immune Defic Syndr. 2004 Mar 1;35(3):269-73

Pilarski LM, Paine D, McElhaney JE, Cass CE, Belch AR

Multidrug transporter P-glycoprotein 170 as a differentiation antigen on normal human lymphocytes and thymocytes: modulation with differentiation stage and during aging

Am J Hematol. 1995 Aug;49(4):323-35

Poland SD, Rice GP, Dekaban GA

HIV-1 infection of human brain-derived microvascular endothelial cells in vitro

J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 1995 Apr 15;8(5):437-45

Polli JW, Jarrett JL, Studenberg SD, Humphreys JE, Dennis SW, Brouwer KR, Woolley JL

Role of P-glycoprotein on the CNS disposition of amprenavir (141W94), an HIV protease inhibitor
Pharm Res. 1999 Aug;16(8):1206-12

Pons JC, Taburet AM, Singlas E, Delfraissy JF, Papiernik E

Placental passage of azathiothymidine (AZT) during the second trimester of pregnancy: study by direct fetal blood sampling under ultrasound

Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 1991 Jul 25;40(3):229-31

Pozniak AL, Gallant JE, DeJesus E, Arribas JR, Gazzard B, Campo RE, Chen SS, McColl D, Enejosa J, Toole JJ, Cheng AK

Tenofovir disoproxil fumarate, emtricitabine, and efavirenz versus fixed-dose zidovudine/lamivudine and efavirenz in antiretroviral-naïve patients: virologic, immunologic, and morphologic changes--a 96-week analysis
J Acquir Immune Defic Syndr. 2006 Dec 15;43(5):535-40

Prado JG, Wrin T, Beauchaine J, Ruiz L, Petropoulos CJ, Frost SD, Clotet B, D'Aquila RT, Martinez-Picado J

Amprenavir-resistant HIV-1 exhibits lopinavir cross-resistance and reduced replication capacity
AIDS. 2002 May 3;16(7):1009-17.

Provost E, Rimm DL

Controversies at the cytoplasmic face of the cadherin-based adhesion complex

Curr Opin Cell Biol. 1999 Oct;11(5):567-72

Pruvost A, Becher F, Bardouille P, Guerrero C, Creminon C, Delfraissy JF, Goujard C, Grassi J, Bénéch H

Direct determination of phosphorylated intracellular anabolites of stavudine (d4T) by liquid chromatography/tandem mass spectrometry

Rapid Commun Mass Spectrom. 2001;15(16):1401-8

Pruvost A, Théodoro F, Agrofoglio L, Negredo E, Bénéch H

Specificity enhancement with LC-positive ESI-MS/MS for the measurement of nucleotides: application to the quantitative determination of carbovir triphosphate, lamivudine triphosphate and tenofovir diphosphate in human peripheral blood mononuclear cells

J Mass Spectrom. 2008 Feb;43(2):224-33

Q

Quinlan GJ, Martin GS, Evans TW

Albumin: biochemical properties and therapeutic potential.

Hepatology. 2005 Jun;41(6):1211-9

R

Rappa G, Finch RA, Sartorelli AC, Lorico A

New insights into the biology and pharmacology of the multidrug resistance protein (MRP) from gene knockout models

Biochem Pharmacol. 1999 Aug 15;58(4):557-62

Ratner L, Haseltine W, Patarca R, Livak KJ, Starcich B, Josephs SF, Doran ER, Rafalski JA, Whitehorn EA, Baumeister K.

Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III

Nature. 1985, 313(6000):277-84

Rautio J, Humphreys JE, Webster LO, Balakrishnan A, Keogh JP, Kunta JR, Serabjit-Singh CJ, Polli JW

In vitro p-glycoprotein inhibition assays for assessment of clinical drug interaction potential of new drug candidates: a recommendation for probe substrates

Drug Metab Dispos. 2006 May;34(5):786-92

Ray AS

Intracellular interactions between nucleos(t)ide inhibitors of HIV reverse transcriptase
AIDS Rev. 2005 Apr-Jun;7(2):113-25

Ray AS, Cihlar T, Robinson KL, Tong L, Vela JE, Fuller MD, Wieman LM, Eisenberg EJ, Rhodes GR

Mechanism of active renal tubular efflux of Tenofovir
Antimicrob Agents Chemother. 2006 Oct;50(10):3297-304

Reese TS, Karnovsky MJ

Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase
J Cell Biol. 1967 Jul;34(1):207-17

Reid S, Dwyer J

Insomnia in HIV infection: a systematic review of prevalence, correlates, and management.
Psychosom Med. 2005 Mar-Apr;67(2):260-9

Rieckmann P, Poli G, Fox CH, Kehrl JH, Fauci AS

Recombinant gp120 specifically enhances tumor necrosis factor-alpha production and Ig secretion in B lymphocytes from HIV-infected individuals but not from seronegative donors
J Immunol. 1991 Nov 1;147(9):2922-7

Risau W, Wolburg H

Development of the blood-brain barrier
Trends Neurosci. 1990 May;13(5):174-8

Ritter CA, Jedlitschky G, Meyer zu Schwabedissen H, Grube M, Köck K, Kroemer HK

Cellular export of drugs and signaling molecules by the ATP-binding cassette transporters MRP4 (ABCC4) and MRP5 (ABCC5)
Drug Metab Rev. 2005;37(1):253-78

Robbins BL, Srinivas RV, Kim C, Bischoffberger N, Fridland A

Anti-human immunodeficiency virus activity and cellular metabolism of a potential prodrug of the acyclic nucleoside phosphonate 9-R-(2-phosphonomethoxypropyl)adenine (PMPA), Bis(isopropylloxymethylcarbonyl) PMPA
Antimicrob Agents Chemother. 1998 Mar;42(3):612-7

Rodriguez JF, Rodriguez JL, Santana J, García H, Rosario O

Simultaneous quantitation of intracellular zidovudine and lamivudine triphosphates in human immunodeficiency virus-infected individuals
Antimicrob Agents Chemother. 2000 Nov;44(11):3097-100

Rodríguez-Baeza A, Reina-de la Torre F, Poca A, Martí M, Garnacho A

Morphological features in human cortical brain microvessels after head injury: a three-dimensional and immunocytochemical study
Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. 2003 Jul;273(1):583-93

Rohlf C, Glazer RI.

Regulation of multidrug resistance through the cAMP and EGF signalling pathways
Cell Signal. 1995 Jul;7(5):431-43

Roman F, Gonzalez D, Lambert C, Deroo S, Fischer A, Baurith T, Staub T, Boulmé R, Arendt V, Schneider F, Hemmer R, Schmit JC

Uncommon mutations at residue positions critical for enfuvirtide (T-20) resistance in enfuvirtide-naïve patients infected with subtype B and non-B HIV-1 strains
J Acquir Immune Defic Syndr. 2003 Jun 1;33(2):134-9

Romero IA, Prevost MC, Perret E, Adamson P, Greenwood J, Couraud PO, Ozden S

Interactions between brain endothelial cells and human T-cell leukemia virus type 1-infected lymphocytes: mechanisms of viral entry into the central nervous system
J Virol. 2000 Jul;74(13):6021-30

Ronaldson PT, Lee G, Dallas S, Bendayan R

Involvement of P-glycoprotein in the transport of saquinavir and indinavir in rat brain microvessel endothelial and microglia cell lines
Pharm Res. 2004 May;21(5):811-8

Roninson IB, Chin JE, Choi KG, Gros P, Housman DE, Fojo A, Shen DW, Gottesman MM, Pastan I

Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells
Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Jun;83(12):4538-42

Rosen O, Sharon M, Quadt-Akabayov SR, Anglister J.

Molecular switch for alternative conformations of the HIV-1 V3 region: implications for phenotype conversion.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Sep 19;103(38):13950-5

Rosenberg MF, Callaghan R, Ford RC, Higgins CF

Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis
J Biol Chem. 1997 Apr 18;272(16):10685-94

Rosenfeld JM, Vargas R Jr, Xie W, Evans RM

Genetic profiling defines the xenobiotic gene network controlled by the nuclear receptor pregnane X receptor
Mol Endocrinol. 2003 Jul;17(7):1268-82

Rostad SW, Sumi SM, Shaw CM, Olson K, McDougall JK

Human immunodeficiency virus (HIV) infection in brains with AIDS-related leukoencephalopathy
AIDS Res Hum Retroviruses. 1987;3(4):363-73

Roucairol C, Azoulay S, Nevers MC, Créminon C, Lavrut T, Garraffo R, Grassi J, Burger A, Duval D

Quantitative immunoassay to measure plasma and intracellular atazanavir levels: analysis of drug accumulation in cultured T cells
Antimicrob Agents Chemother. 2007 Feb;51(2):405-11

Roux FS, Mokni R, Hughes CC, Clouet PM, Lefauconnier JM, Bourre JM

Lipid synthesis by rat brain microvessel endothelial cells in tissue culture
J Neuropathol Exp Neurol. 1989 Jul;48(4):437-47

S

Saag MS

Initiation of antiretroviral therapy: implications of recent findings
Top HIV Med. 2004 Jul-Aug;12(3):83-8

Saag MS, Cahn P, Raffi F, Wolff M, Pearce D, Molina JM, Powderly W, Shaw AL, Mondou E, Hinkle J, Borroto-Esoda K, Quinn JB, Barry DW, Rousseau F; FTC-301A Study Team

Efficacy and safety of emtricitabine vs stavudine in combination therapy in antiretroviral-naïve patients: a randomized trial
JAMA. 2004 Jul 14;292(2):180-9

Sadanand V, Kankesan J, Yusuf A, Stewart C, Rutka JT, Thiessen JJ, Ling V, Rao PM, Rajalakshmi S, Sarma DS

Effect of PSC 833, a potent inhibitor of P-glycoprotein, on the growth of astrocytoma cells in vitro
Cancer Lett. 2003 Jul 30;198(1):21-7

Saito S, Iida A, Sekine A, Miura Y, Ogawa C, Kawauchi S, Higuchi S, Nakamura Y

Identification of 779 genetic variations in eight genes encoding members of the ATP-binding cassette, subfamily C (ABCC/MRP/CFTR)
J Hum Genet. 2002;47(4):147-71

Salzwedel K, Martin DE, Sakalian M

Maturation inhibitors: a new therapeutic class targets the virus structure
AIDS Rev. 2007 Jul-Sep;9(3):162-72

Sawchuk RJ, Yang Z

Investigation of distribution, transport and uptake of anti-HIV drugs to the central nervous system
Adv Drug Deliv Rev. 1999 Oct 18;39(1-3):5-31

Schaub TP, Kartenbeck J, König J, Vogel O, Witzgall R, Kriz W, Keppler D

Expression of the conjugate export pump encoded by the mrp2 gene in the apical membrane of kidney proximal tubules
J Am Soc Nephrol. 1997 Aug;8(8):1213-21

Schaub TP, Kartenbeck J, König J, Spring H, Dörsam J, Staehler G, Störkel S, Thon WF, Keppler D

Expression of the MRP2 gene-encoded conjugate export pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma
J Am Soc Nephrol. 1999 Jun;10(6):1159-69

Schinazi RF, Boudinot FD, Ibrahim SS, Manning C, McClure HM, Liotta DC

Pharmacokinetics and metabolism of racemic 2',3'-dideoxy-5-fluoro-3'-thiacytidine in rhesus monkeys
Antimicrob Agents Chemother. 1992 Nov;36(11):2432-8

Schinkel AH, Jonker JW

Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview
Adv Drug Deliv Rev. 2003 Jan 21;55(1):3-29

Schinkel AH, Kemp S, Dollé M, Rudenko G, Wagenaar E

N-glycosylation and deletion mutants of the human MDR1 P-glycoprotein
J Biol Chem. 1993 Apr 5;268(10):7474-81

Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, van der Valk MA, Robanus-Maandag EC, te Riele HP, et al

Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs
Cell. 1994 May 20;77(4):491-502

Schols D, Pauwels R, Desmyter J, De Clercq E.

Presence of class II histocompatibility DR proteins on the envelope of human immunodeficiency virus demonstrated by FACS analysis
Virology. 1992, 189(1):374-6

Schrager LK, D'Souza MP

Cellular and anatomical reservoirs of HIV-1 in patients receiving potent antiretroviral combination therapy
JAMA. 1998 Jul 1;280(1):67-71

Schuetz JD, Connelly MC, Sun D, Paibir SG, Flynn PM, Srinivas RV, Kumar A, Fridland A

MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs
Nat Med. 1999 Sep;5(9):1048-51

Seelig A, Blatter XL, Wohnsland F

Substrate recognition by P-glycoprotein and the multidrug resistance-associated protein MRP1: a comparison
Int J Clin Pharmacol Ther. 2000 Mar;38(3):111-21

Selik RM, Haverkos HW and Curran JW

Acquired immune deficiency syndrome (AIDS) trends in the United States (1978–1982)
Am. J. Med. 76 (1984), pp. 493–500

Sharom FJ.

The P-glycoprotein multidrug transporter: interactions with membrane lipids, and their modulation of activity
Biochem Soc Trans. 1997; 25(3):1088-96

Sharpless N, Gilbert D, Vandercam B, Zhou JM, Verdin E, Ronnett G, Friedman E, Dubois-Dalcq M

The restricted nature of HIV-1 tropism for cultured neural cells
Virology. 1992 Dec;191(2):813-25

Shaw JP, Sueoko CM, Oliyai R, Lee WA, Arimilli MN, Kim CU, Cundy KC

Metabolism and pharmacokinetics of novel oral prodrugs of 9-[(R)-2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine (PMPA) in dogs
Pharm Res. 1997 Dec;14(12):1824-9

Sherman MP, Greene WC

Slipping through the door: HIV entry into the nucleus
Microbes Infect. 2002; 4(1):67-73

Siakotos AN, Rouser G

Isolation of highly purified human and bovine brain endothelial cells and nuclei and their phospholipid composition
Lipids. 1969 May;4(3):234-9

Siegal FP, Lopez C, Hammer GS, Brown AE, Kornfeld SJ, Gold J, Hassett J, Hirschman SZ, Cunningham-Rundles C, Adelsberg BR

Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions.
N Engl J Med. 1981; 305(24):1439-44

Siest G, Jeannesson E, Marteau JB, Samara A, Marie B, Pfister M, Visvikis-Siest S

Transcription factor and drug-metabolizing enzyme gene expression in lymphocytes from healthy human subjects
Drug Metab Dispos. 2008 Jan;36(1):182-9

Signoretti C, Romagnoli G, Turriziani O, Antonelli G, Dianzani F, Cianfriglia M

Induction of the multidrug-transporter P-glycoprotein by 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) treatment in tumor cell lines
J Exp Clin Cancer Res. 1997 Mar;16(1):29-32

Simon F, Mauciere P, Roques P, Loussert -Ajaka I, Muller-Trutwin MC, Saragosti S, Georges-Courbot MC, Barre-Sinoussi F, Brun-Vezinet F

Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O
Nat Med. 1998; 4(9):1032-7

Singlas E, Pioger JC, Taburet AM, Colaneri S, Fillastre JP

Comparative pharmacokinetics of zidovudine (AZT) and its metabolite (G.AZT) in healthy subjects and HIV seropositive patients
Eur J Clin Pharmacol. 1989;36(6):639-40

Smeets PH, van Aubel RA, Wouterse AC, van den Heuvel JJ, Russel FG

Contribution of multidrug resistance protein 2 (MRP2/ABCC2) to the renal excretion of p-aminohippurate (PAH) and identification of MRP4 (ABCC4) as a novel PAH transporter
J Am Soc Nephrol. 2004 Nov;15(11):2828-35

Smith DM, Kingery JD, Wong JK, Ignacio CC, Richman DD, Little SJ

The prostate as a reservoir for HIV-1
AIDS. 2004 Jul 23;18(11):1600-2

Solon EG, Balani SK, Luo G, Yang TJ, Haines PJ, Wang L, Demond T, Diamond S, Christ DD, Gan LS, Lee FW

Interaction of ritonavir on tissue distribution of a [(14)c]L-valinamide, a potent human immunodeficiency virus-1 protease inhibitor, in rats using quantitative whole-body autoradiography
Drug Metab Dispos. 2002 Nov;30(11):1164-9

Speck RR, Yu XF, Hildreth J, Flexner C

Differential effects of p-glycoprotein and multidrug resistance protein-1 on productive human immunodeficiency virus infection
J Infect Dis. 2002 Aug 1;186(3):332-40

Srinivas RV, Middlemas D, Flynn P, Fridland A

Human immunodeficiency virus protease inhibitors serve as substrates for multidrug transporter proteins MDR1 and MRP1 but retain antiviral efficacy in cell lines expressing these transporters
Antimicrob Agents Chemother. 1998 Dec;42(12):3157-62

Staddon JM, Herrenknecht K, Schulze C, Smales C, Rubin LL

Signal transduction at the blood-brain barrier
Biochem Soc Trans. 1995 Aug;23(3):475-9

Starcich BR, Hahn BH, Shaw GM, McNeely PD, Modrow S, Wolf H, Parks ES, Parks WP, Josephs SF, Gallo RC

Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS
Cell. 1986, 45(5):637-48

Strazielle N, Ghersi-Egea JF

Factors affecting delivery of antiviral drugs to the brain
Rev Med Virol. 2005 Mar-Apr;15(2):105-33

Steinberg MS, McNutt PM

Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions
Curr Opin Cell Biol. 1999 Oct;11(5):554-60

Stevenson M, Stanwick TL, Dempsey MP, Lamonica CA

HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration
EMBO J. 1990 May;9(5):1551-60

Stone ND, Dunaway SB, Flexner C, Tierney C, Calandra GB, Becker S, Cao YJ, Wiggins IP, Conley J, MacFarland RT, Park JG, Lalama C, Snyder S, Kallungal B, Klingman KL, Hendrix CW

Multiple-dose escalation study of the safety, pharmacokinetics, and biologic activity of oral AMD070, a selective CXCR4 receptor inhibitor, in human subjects
Antimicrob Agents Chemother. 2007 Jul;51(7):2351-8

Storch CH, Theile D, Lindenmaier H, Haefeli WE, Weiss J

Comparison of the inhibitory activity of anti-HIV drugs on P-glycoprotein
Biochem Pharmacol. 2007 May 15;73(10):1573-81

Störmer E, von Moltke LL, Perloff MD, Greenblatt DJ

Differential modulation of P-glycoprotein expression and activity by non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors in cell culture
Pharm Res. 2002 Jul;19(7):1038-45

Sugiura W, Matsuda Z, Yokomaku Y, Hertogs K, Larder B, Oishi T, Okano A, Shiino T, Tatsumi M, Matsuda M, Abumi H, Takata N, Shirahata S, Yamada K, Yoshikura H, Nagai Y

Interference between D30N and L90M in selection and development of protease inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1
Antimicrob Agents Chemother. 2002 Mar;46(3):708-15

Sullivan GF, Yang JM, Vassil A, Yang J, Bash-Babula J, Hait WN

Regulation of expression of the multidrug resistance protein MRP1 by p53 in human prostate cancer cells
J Clin Invest. 2000 May;105(9):1261-7

Sun H, Dai H, Shaik N, Elmquist WF

Drug efflux transporters in the CNS
Adv Drug Deliv Rev. 2003 Jan 21;55(1):83-105

Synold TW, Dussault I, Forman BM

The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux
Nat Med. 2001 May;7(5):584-90

T

Taburet AM, Piketty C, Chazallon C, Vincent I, Gérard L, Calvez V, Clavel F, Aboulker JP, Girard PM

Interactions between atazanavir-ritonavir and tenofovir in heavily pretreated human immunodeficiency virus-infected patients
Antimicrob Agents Chemother. 2004 Jun;48(6):2091-6

Takahashi K, Wesselingh SL, Griffin DE, McArthur JC, Johnson RT, Glass JD

Localization of HIV-1 in human brain using polymerase chain reaction/in situ hybridization and immunocytochemistry
Ann Neurol. 1996 Jun;39(6):705-11

Takasawa K, Terasaki T, Suzuki H, Ooie T, Sugiyama Y (a)

Distributed model analysis of 3'-azido-3'-deoxythymidine and 2',3'-dideoxyinosine distribution in brain tissue and cerebrospinal fluid
J Pharmacol Exp Ther. 1997 Sep;282(3):1509-17

Takasawa K, Terasaki T, Suzuki H, Sugiyama Y (b)

In vivo evidence for carrier-mediated efflux transport of 3'-azido-3'-deoxythymidine and 2',3'-dideoxyinosine across the blood-brain barrier via a probenecid-sensitive transport system
J Pharmacol Exp Ther. 1997 Apr;281(1):369-75

Takara K, Tsujimoto M, Ohnishi N, Yokoyama T

Effects of continuous exposure to digoxin on MDR1 function and expression in Caco-2 cells
J Pharm Pharmacol. 2003 May;55(5):675-81

Tenner-Racz K, Stellbrink HJ, van Lunzen J, Schneider C, Jacobs JP, Raschdorff B, Grosschupff G, Steinman RM, Racz P

The unenlarged lymph nodes of HIV-1-infected, asymptomatic patients with high CD4 T cell counts are sites for virus replication and CD4 T cell proliferation. The impact of highly active antiretroviral therapy
J Exp Med. 1998 Mar 16;187(6):949-59

Terasaki T, Ohtsuki S

Brain-to-blood transporters for endogenous substrates and xenobiotics at the blood-brain barrier: an overview of biology and methodology
NeuroRx. 2005 Jan;2(1):63-72

Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC.

Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues
Proc Natl Acad Sci U S A. 1987, 84(21):7735-8

Thomas SA

Anti-HIV drug distribution to the central nervous system
Curr Pharm Des. 2004;10(12):1313-24

Thomas SA, Bye A, Segal MB

Transport characteristics of the anti-human immunodeficiency virus nucleoside analog, abacavir, into brain and cerebrospinal fluid

J Pharmacol Exp Ther. 2001 Sep;298(3):947-53

Thomas SA, Segal MB

The transport of the anti-HIV drug, 2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine (D4T), across the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers

Br J Pharmacol. 1998 Sep;125(1):49-54

Torres-Muñoz J, Stockton P, Tacoronte N, Roberts B, Maronpot RR, Petito CK

Detection of HIV-1 gene sequences in hippocampal neurons isolated from postmortem AIDS brains by laser capture microdissection

J Neuropathol Exp Neurol. 2001 Sep;60(9):885-92

Trillo-Pazos G, Diamanturos A, Rislove L, Menza T, Chao W, Belem P, Sadiq S, Morgello S, Sharer L, Volsky DJ

Detection of HIV-1 DNA in microglia/macrophages, astrocytes and neurons isolated from brain tissue with HIV-1 encephalitis by laser capture microdissection

Brain Pathol. 2003 Apr;13(2):144-54

Tsukita S, Furuse M

The structure and function of claudins, cell adhesion molecules at tight junctions

Ann N Y Acad Sci. 2000;915:129-35

Tsukita S, Furuse M, Itoh M

Multifunctional strands in tight junctions.

Nat Rev Mol Cell Biol. 2001 Apr;2(4):285-93

Turriziani O, Gianotti N, Falasca F, Boni A, Vestri AR, Zoccoli A, Lazzarin A, Antonelli G

Expression levels of MDR1, MRP1, MRP4, and MRP5 in peripheral blood mononuclear cells from HIV infected patients failing antiretroviral therapy

J Med Virol. 2008 May;80(5):766-71

U

Uchiumi T, Hinoshita E, Haga S, Nakamura T, Tanaka T, Toh S, Furukawa M, Kawabe T, Wada M, Kagotani K, Okumura K, Kohno K, Akiyama S, Kuwano M

Isolation of a novel human canalicular multispecific organic anion transporter, cMOAT2/MRP3, and its expression in cisplatin-resistant cancer cells with decreased ATP-dependent drug transport

Biochem Biophys Res Commun. 1998 Nov 9;252(1):103-10

Ueda K, Pastan I, Gottesman MM

Isolation and sequence of the promoter region of the human multidrug-resistance (P-glycoprotein) gene

J Biol Chem. 1987, 262(36):17432-6

Ueda K, Okamura N, Hirai M, Tanigawara Y, Saeki T, Kioka N, Komano T, Hori R

Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone

J Biol Chem. 1992, 267(34):24248-52

V

Van der Sandt IC, Vos CM, Nabulsi L, Blom-Roosemalen MC, Voorwinden HH, de Boer AG, Breimer DD

Assessment of active transport of HIV protease inhibitors in various cell lines and the in vitro blood-brain barrier

AIDS. 2001 Mar 9;15(4):483-91

Van Veen HW, Margolles A, Müller M, Higgins CF, Konings WN

The homodimeric ATP-binding cassette transporter LmrA mediates multidrug transport by an alternating two-site (two-cylinder engine) mechanism
EMBO J. 2000 Jun 1;19(11):2503-14

Veau C, Faivre L, Tardivel S, Soursac M, Banide H, Lacour B, Farinotti R

Effect of interleukin-2 on intestinal P-glycoprotein expression and functionality in mice
J Pharmacol Exp Ther. 2002 Aug;302(2):742-50

Veldkamp AI, Weverling GJ, Lange JM, Montaner JS, Reiss P, Cooper DA, Vella S, Hall D, Beijnen JH, Hoetelmans RM

High exposure to nevirapine in plasma is associated with an improved virological response in HIV-1-infected individuals
AIDS. 2001 Jun 15;15(9):1089-95

Vella S

Clinical experience with saquinavir
AIDS. 1995 Dec;9 Suppl 2:S21-S25

Vingerhoets J, Azijn H, Fransen E, De Baere I, Smeulders L, Jochmans D, Andries K, Pauwels R, de Béthune MP

TMC125 displays a high genetic barrier to the development of resistance: evidence from in vitro selection experiments
J Virol. 2005 Oct;79(20):12773-82

Vishnuvardhan D, Moltke LL, Richert C, Greenblatt DJ

Lopinavir: acute exposure inhibits P-glycoprotein; extended exposure induces P-glycoprotein
AIDS. 2003 May 2;17(7):1092-4

W

Wain-Hobson S, Sonigo P, Danos O, Cole S, Alizon M

Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV
Cell. 1985, 40(1):9-17

Wang Q, Beck WT

Transcriptional suppression of multidrug resistance-associated protein (MRP) gene expression by wild-type p53
Cancer Res. 1998 Dec 15;58(24):5762-9

Ward JM, O'Leary TJ, Baskin GB, Benveniste R, Harris CA, Nara PL, Rhodes RH

Immunohistochemical localization of human and simian immunodeficiency viral antigens in fixed tissue sections
Am J Pathol. 1987 May;127(2):199-205

Washington CB, Duran GE, Man MC, Sikic BI, Blaschke TF

Interaction of anti-HIV protease inhibitors with the multidrug transporter P-glycoprotein (P-gp) in human cultured cells
J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 1998 Nov 1;19(3):203-9

Watkins BA, Dorn HH, Kelly WB, Armstrong RC, Potts BJ, Michaels F, Kufra CV, Dubois-Dalcq M

Specific tropism of HIV-1 for microglial cells in primary human brain cultures
Science. 1990 Aug 3;249(4968):549-53

Wei X, Decker JM, Liu H, Zhang Z, Arani RB, Kilby JM, Saag MS, Wu X, Shaw GM, Kappes JC

Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy
Antimicrob Agents Chemother. 2002 Jun;46(6):1896-905

Weiss J, Dormann SM, Martin-Facklam M, Kerpen CJ, Ketabi-Kiyanvash N, Haefeli WE

Inhibition of P-glycoprotein by newer antidepressants

J Pharmacol Exp Ther. 2003 Apr;305(1):197-204

Weiss J, Rose J, Storch CH, Ketabi-Kiyanvash N, Sauer A, Haefeli WE, Efferth T (a)

Modulation of human BCRP (ABCG2) activity by anti-HIV drugs

J Antimicrob Chemother. 2007 Feb;59(2):238-45

Weiss J, Theile D, Ketabi-Kiyanvash N, Lindenmaier H, Haefeli WE (b)

Inhibition of MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, and MRP3/ABCC3 by nucleoside, nucleotide, and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors

Drug Metab Dispos. 2007 Mar;35(3):340-4

Weiss J, Weis N, Ketabi-Kiyanvash N, Storch CH, Haefeli WE

Comparison of the induction of P-glycoprotein activity by nucleotide, nucleoside, and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors

Eur J Pharmacol. 2008 Jan 28;579(1-3):104-9

Weniger BG, Takebe Y, Ou CY, Yamazaki S

The molecular epidemiology of HIV in Asia

AIDS. 1994;8 Suppl 2:S13-28

Whitcomb JM, Parkin NT, Chappey C, Hellmann NS, Petropoulos CJ

Broad nucleoside reverse-transcriptase inhibitor cross-resistance in human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates

J Infect Dis. 2003 Oct 1;188(7):992-1000

White KL, Margot NA, Wrin T

Molecular mechanisms of resistance to human immunodeficiency virus type 1 with reverse transcriptase mutations K65R and K65R + M184V and their effects on enzyme function and viral replication capacity

Antimicrob Agents Chemother. 2002, 46 : 3437-3446

Wieggers K, Rutter G, Kottler H, Tessmer U, Hohenberg H, Krausslich HG.

Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polypeptide cleavage sites

J Virol. 1998, 72(4):2846-54

Wielinga PR, Reid G, Challa EE, van der Heijden I, van Deemter L, de Haas M, Mol C, Kuil AJ, Groeneveld E, Schuetz JD, Brouwer C, De Abreu RA, Wijnholds J, Beijnen JH, Borst P

Thiopurine metabolism and identification of the thiopurine metabolites transported by MRP4 and MRP5 overexpressed in human embryonic kidney cells

Mol Pharmacol. 2002 Dec;62(6):1321-31

Wijnholds J, Mol CA, van Deemter L, de Haas M, Scheffer GL, Baas F, Beijnen JH, Scheper RJ, Hatse S, De Clercq E, Balzarini J, Borst P

Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs

Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jun 20;97(13):7476-81

Wiley CA, Achim CL, Christopherson C, Kidane Y, Kwok S, Masliah E, Mellors J, Radhakrishnan L, Wang G, Soontornniyomkij V

HIV mediates a productive infection of the brain

AIDS. 1999 Oct 22;13(15):2055-9

Wiley CA, Nelson JA

Role of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus in AIDS encephalitis

Am J Pathol. 1988 Oct;133(1):73-81

Wiley CA, Schrier RD, Nelson JA, Lampert PW, Oldstone MB

Cellular localization of human immunodeficiency virus infection within the brains of acquired immune deficiency syndrome patients
Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Sep;83(18):7089-93

Willey RL, Rutledge RA, Dias S, Folks T, Theodore T, Buckler CE, Martin MA

Identification of conserved and divergent domains within the envelope gene of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus
Proc Natl Acad Sci U S A. 1986, 83(14):5038-42

Williams SA, Greene WC.

Regulation of HIV-1 latency by T-cell activation
Cytokine. 2007 Jul;39(1):63-74

Williams GC, Liu A, Knipp G, Sinko PJ

Direct evidence that saquinavir is transported by multidrug resistance-associated protein (MRP1) and canalicular multispecific organic anion transporter (MRP2)
Antimicrob Agents Chemother. 2002 Nov;46(11):3456-62

Williams GC, Sinko PJ

Oral absorption of the HIV protease inhibitors: a current update
Adv Drug Deliv Rev. 1999 Oct 18;39(1-3):211-238

Winston JA, Bruggeman LA, Ross MD, Jacobson J, Ross L, D'Agati VD, Klotman PE, Klotman ME

Nephropathy and establishment of a renal reservoir of HIV type 1 during primary infection
N Engl J Med. 2001 Jun 28;344(26):1979-84

Witvrouw M, Pannecouque C, Switzer WM, Folks TM, De Clercq E, Heneine W

Susceptibility of HIV-2, SIV and SHIV to various anti-HIV-1 compounds: implications for treatment and postexposure prophylaxis
Antivir Ther. 2004 Feb;9(1):57-65

Wolburg H, Lippoldt A

Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation
Vascul Pharmacol. 2002 Jun;38(6):323-37

Wright SR, Boag AH, Valdimarsson G, Hipfner DR, Campling BG, Cole SP, Deeley RG

Immunohistochemical detection of multidrug resistance protein in human lung cancer and normal lung
Clin Cancer Res. 1998 Sep;4(9):2279-89

Wu D, Clement JG, Pardridge WM

Low blood-brain barrier permeability to azidothymidine (AZT), 3TC, and thymidine in the rat
Brain Res. 1998 Apr 27;791(1-2):313-6

Wyen C, Fuhr U, Frank D, Aarnoutse R, Klaassen T, Lazar A, Seeringer A, Doroshenko O, Kirchheiner J, Abdulrazik F, Schmeisser N, Lehmann C, Hein W, Schömig E, Burger D, Fätkenheuer G, Jetter A

Effect of an Antiretroviral Regimen Containing Ritonavir Boosted Lopinavir on Intestinal and Hepatic CYP3A, CYP2D6 and P-glycoprotein in HIV-infected Patients
Clin Pharmacol Ther. 2008 Jan 9

Y

Yang Z, Brundage RC, Barbhuiya RH, Sawchuk RJ

Microdialysis studies of the distribution of stavudine into the central nervous system in the freely-moving rat
Pharm Res. 1997 Jul;14(7):865-72

Young B, Johnson S, Bahktiari M, Shugarts D, Young RK, Allen M, Ramey RR 2nd, Kuritzkes DR
Resistance mutations in protease and reverse transcriptase genes of human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients with combination antiretroviral therapy failure
J Infect Dis. 1998 Nov;178(5):1497-501

Yusa K, Oh-hara T, Yamazaki A, Tsukahara S, Satoh W, Tsuruo T
Cross-resistance to anti-HIV nucleoside analogs in multidrug-resistant human cells
Biochem Biophys Res Commun. 1990 Jun 29;169(3):986-90

Z

Zack JA, Arrigo SJ, Weitsman SR, Go AS, Haislip A, Chen IS.
HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure
Cell. 1990 Apr 20;61(2):213-22

Zack JA, Haislip AM, Krogstad P, Chen IS.
Incompletely reverse-transcribed human immunodeficiency virus type 1 genomes in quiescent cells can function as intermediates in the retroviral life cycle
J Virol. 1992 Mar;66(3):1717-25

Zhang Y, Schuetz JD, Elmquist WF, Miller DW
Plasma membrane localization of multidrug resistance-associated protein homologs in brain capillary endothelial cells
J Pharmacol Exp Ther. 2004 Nov;311(2):449-55

Zhou Y, Zhang H, Siliciano JD, Siliciano RF.
Kinetics of human immunodeficiency virus type 1 decay following entry into resting CD4+ T cells
J Virol. 2005 Feb;79(4):2199-210

Zhu Q, Center MS
Evidence that SP1 modulates transcriptional activity of the multidrug resistance-associated protein gene
DNA Cell Biol. 1996 Feb;15(2):105-11

Zlokovic BV, Apuzzo ML
Strategies to circumvent vascular barriers of the central nervous system
Neurosurgery. 1998 Oct;43(4):877-8

ANNEXES

INHIBITOR and SUBSTRATE PROPERTIES of EMTRICITABINE

in favor of INTERACTIONS with MRP1



P 3.2/02

24-27th October 2007

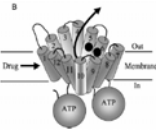
anRS

L. BOUSQUET¹, A. PRUVOST¹, N.DIDIER¹, R. FARINOTTI², A. MABONDZO¹

1- CEA, iBiTec-S, Service de pharmacologie et d'Immunoanalyse, Gif sur Yvette, France
2- Département de pharmacie clinique - Faculté de pharmacie Paris XI, Châtenay-Malabry, France



INTRODUCTION



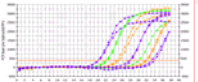
P-glycoprotein (Loo et al., 2003)

- ✗ Efflux proteins (P-glycoprotein, multidrug resistance-associated proteins) have been shown to greatly affect the uptake of antiretroviral drugs by cells and to hamper their access to the HIV-1 replication site. The active efflux of these drug might produce subtherapeutic drug level and favor both resistant viral strains and the emergence of sanctuary sites.
- ✗ This study was performed to investigate whether emtricitabine (FTC) is substrate and/or inhibitor of MRP-1. Moreover, we report the impact of FTC combined with protease inhibitors (PIs : ritonavir, lopinavir, atazanavir) on Pgp and MRP expression and function in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors.

METHODS

- ✗ Quantitative real time PCR (Q-RT PCR) was performed in order to determine the efflux transporter mRNA level in PBMCs.
- ✗ Following 72-h incubation with FTC (5 μ M) alone or combined with PIs (RTV 1 μ M, LPV 5 μ M, ATV 5 μ M) :
 - Pgp and MRP1 expression was determined by direct immunofluorescence (UIC2:rPE antibody specific for Pgp; QCRL:rPE antibody specific for MRP1)
 - Pgp and MRP1 functionality was assessed by measuring fluorescent dye efflux¹ (calcein-AM 100 nM) either with or without inhibitors (verapamil 30 μ M: non specific inhibitor, cyclosporine A 2 μ M: Pgp specific inhibitor, MK571 30 μ M: MRP specific inhibitor)
- ✗ FTC substrate properties was determined by quantification in PBMCs (LC-MS/MS²) following 1-h incubation with or without specific efflux proteins inhibitors (cyclosporine A 2 μ M or MK571 50 μ M)
- ✗ MRP1 inhibition by FTC was assessed using calcein fluorescence (100 nM) and [³H]-vincristine radioactivity (3.7 Bq/ml) accumulations
- ✗ The significance of differences between groups and controls was evaluated by using Student's t-test: * p < 0.05

Example of PCR amplification



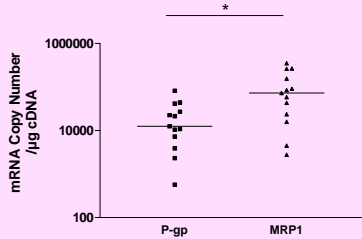
RESULTS

MDR1 and MRP1 mRNA levels on PBMCs from healthy volunteers

(N=12) by real-time RT-PCR

PBMCs express high levels of both MDR1 (encoding for Pgp) and MRP1 mRNA copy number, whereas MRP2 and MRP3 are not detectable.

mRNA level of MRP1 is 5-fold higher than MDR1 one (p=0.0265)

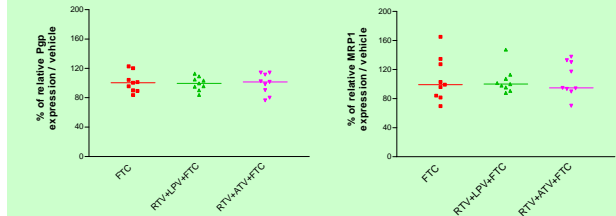


Expression of both transporters (Pgp and MRP1) showed inter-individual variation

Since MRP2 and MRP3 are not detectable in our experimental system, we talk about MRP1 expression instead of MRP family member

72-h treatment on lymphocyte multidrug transporter expression (N=9)

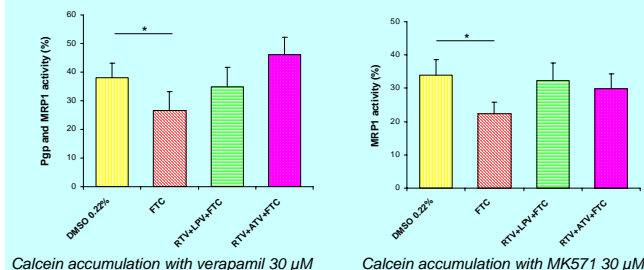
In comparison with the vehicle control (0.22% DMSO), cell treatment with FTC alone or in combination with PIs (rtv/LPV or rtv/ATV) did not show statistically significant change in Pgp or MRP1 expression.



72-h treatment on lymphocyte multidrug transporter function

The decrease in Pgp and MRP1 activity (with verapamil) was statistically significant (p=0.038)

The decrease in MRP1 activity (with MK571) was statistically significant (p=0.025)



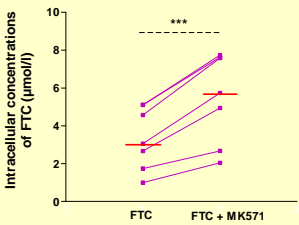
Calcein accumulation with verapamil 30 μ M

Calcein accumulation with MK571 30 μ M

FTC alone decreases MRP1 function following 72-h treatment

Effects of drug efflux inhibitors on FTC accumulation (N=7)

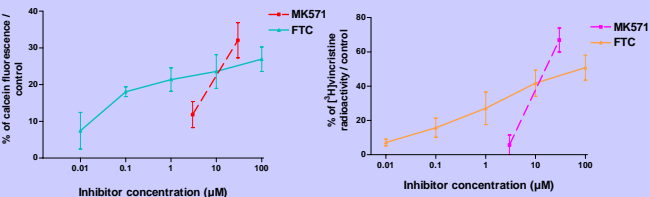
MK571 50 μ M, but not cyclosporine A 2 μ M, causes a statistically significant increase in intracellular FTC accumulation (p=0.0005)



FTC is substrate of MRP1

Inhibition of calcein-AM and [³H]-vincristine transport (N=5)

FTC causes a statistically significant and concentration-dependant increase of calcein and [³H]-vincristine accumulations in PBMCs



FTC inhibits efflux of two MRP1 substrates

CONCLUSION

Q-RT PCR show that PBMCs express high levels of both Pgp and MRP1 mRNA with interindividual variation.

Our results show that emtricitabine (FTC) has both inhibitor and substrate characteristics with MRP1 in PBMCs *in vitro*. These properties are not correlated with efflux protein expression, which suggests a direct interaction between MRP1 and FTC.

Drug accumulation in the case of FTC combination with tenofovir (TFV) or other NRTIs remains to be determined. This may highlight some reported observations in the use of FTC and TFV drugs as a dual NRTI backbone in combination therapy³.

REFERENCES

- Legrand O, Simonin G, Perrot J.Y., Zittoun R., Marie J.P. Pgp and MRP activities using calcein-AM are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia patients. Blood. 1998 Jun 15;91(12):4480-8.
- Levi M., Pruvost A. 2006 Sensitive HPLC-ESI-MS/MS method for the simultaneous quantitative determination of Abacavir, Lamivudine and Tenofovir in human plasma. 7th international Workshop on clinical pharmacology of HIV Therapy
- Borrito-Esoda K, Vela JE, Myrick F, Ray AS, Miller MD (2006) In vitro evaluation of the anti-HIV activity and metabolic interactions of tenofovir and emtricitabine. Antivir Ther. 11(3):377-84

Acknowledgments:

We would like to thank the "Agence Nationale de Recherche sur le SIDA" for financial support

MODULATION of ABC TRANSPORTER FUNCTION by ATAZANAVIR in LYMPHOCYTES and its TRANSPORT across a HUMAN *in vitro* BLOOD-BRAIN BARRIER



P3.2/03

L. BOUSQUET¹, C. ROUCAIROL², M.C. NEVERS¹, C. CREMINON¹, R. FARINOTTI³, A. MABONDZO¹

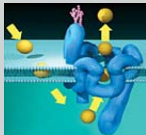
1- CEA, iBiTec-S, Service de pharmacologie et d'immunanalyse, Gif sur Yvette, France
2- Université de Nice Sophia Antipolis, Laboratoire de Chimie des Molécules Bioactives et Arômes UMR 6001, Nice, France
3- Département de pharmacie clinique - Faculté de pharmacie Paris XI, Châtenay-Malabry, France



INTRODUCTION

✖ Efflux proteins (P-glycoprotein Pgp, multidrug resistance-associated proteins MRPs, breast cancer resistance protein BCRP) situated on the plasma membrane, have been shown to extrude HIV protease inhibitors (PIs) from the cell. These transporters are present on many barrier sites throughout the body, such as the blood-brain barrier (BBB), and on many circulating cells, such as CD4 cells; and they could reduce PI concentration in sanctuary sites or target sites for HIV-1 replication.

✖ This study aims at analyzing the potential of the anti-retroviral drug atazanavir (ATV) to modulate Pgp and MRP expression and function on lymphocytes. Moreover, we report the interaction of ATV with Pgp, MRPs and BCRP on an *in vitro* BBB model



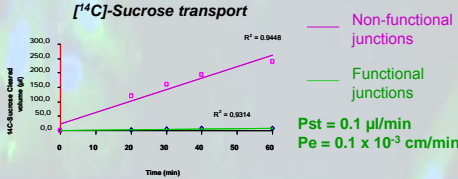
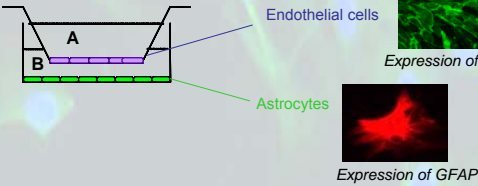
P-glycoprotein

METHODS

✖ Following 72-h incubation with ATV (5 μ M) alone or combined with ritonavir 1 μ M (RTV) :

- Pgp and MRP1 expression was determined by direct immunofluorescence using specific mAb (UIC2:rPE antibody specific for Pgp; QCRL:rPE antibody specific for MRP1)
- Pgp and MRP1 functionality was assessed by measuring fluorescent dye efflux (calcein-AM 100 nM) either with or without inhibitors (verapamil 30 μ M: non specific inhibitor, cyclosporine A 2 μ M: Pgp specific inhibitor, MK571 30 μ M: MRP specific inhibitor)

✖ Validation of the *in vitro* BBB model^{1,2}:



Barrier integrity :

- [¹⁴C]-Sucrose (12.95 MBq/ μ mol) paracellular transport studies
- Efflux transporter expression (Pgp, MRP1, BCRP) on endothelial cells
- [³H]-Digoxine transepithelial transport studies: Digoxine is a Pgp substrate, its transport A→B increases with the Pgp inhibitor PSC833

✖ ATV transport quantification was determined by competitive ELISA assay³ through the BBB model, with or without specific efflux protein inhibitor (20 μ M PSC833: Pgp inhibitor, 20 μ M probenecid: MRP inhibitor, 20 μ M Ko143: BCRP inhibitor)

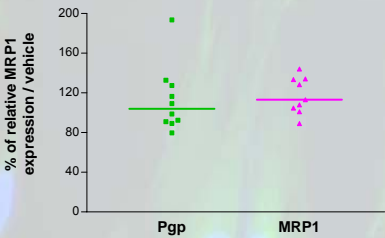
✖ The significance of differences between groups and controls was evaluated by using Student's t-test; *: p < 0.05

RESULTS

72-h treatment on lymphocyte multidrug transporter expression (N=10)

In comparison with the vehicle control (0.22% DMSO), cell treatment with ATV did not show statistically significant change in Pgp or MRP1 expression.

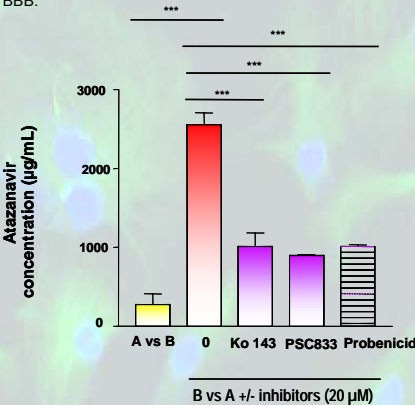
Expression of both transporters (Pgp and MRP1) showed inter-individual variation.



In vitro human BBB atazanavir transport study (N=3)

Basal-to-apical transport was 19-fold higher than the apical to-basal transport, suggesting a very low permeability of brain endothelial monolayer to atazanavir.

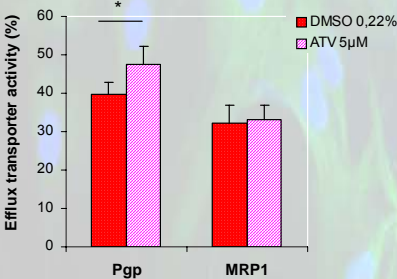
Pretreatment of cells with PSC833, Ko-143 or probenecid at a concentration of 20 μ M significantly decreased the efflux clearance of atazanavir (P < 0.05), suggesting that atazanavir is substrate of Pgp, MRPs and BCRP at the level of *in vitro* coculture-based model of human BBB.



72-h treatment on lymphocyte multidrug transporter function (N=10)

ATV 5 μ M increased Pgp function (p=0.02) represented by the effect of cyclosporine A 2 μ M on calcein-AM accumulation.

MK571 30 μ M caused no statistically significant change in calcein-AM uptake : ATV did not change MRP1 function.



ATV increase Pgp function following 72-h treatment

CONCLUSION

In summary, we have demonstrated that atazanavir does not modulate Pgp expression on human lymphocytes but induces Pgp function, suggesting it interacts with Pgp. Our findings suggest the broad overlapping ATV substrate specificity of efflux pumps (Pgp, MRPs and BCRP) which play a pivotal role in the low permeability of the brain to ATV, limiting the efficacy of this anti-HIV-1 agent within the cell layers and in the CNS.

REFERENCES

(1)Josserand V, Pelerin H, de BB, Jego B, Kuhnast B, Hinnen F, Duconge F, Boisgard R, Beuvon F, Chassoux F, umas-Dupont C, Ezan E, Dolle F, Mabondzo A and Tavitian B (2006) Evaluation of drug penetration into the brain: a double study by *in vivo* imaging with positron emission tomography and using an *in vitro* model of the human blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 316:79-86.

(2) Megard I, Garrigues A, Orlowski S, Jorajuria S, Clayette P, Ezan E and Mabondzo A (2002) A co-culture-based model of human blood-brain barrier: application to active transport of indinavir and *in vivo-in vitro* correlation. *Brain Res* 927:153-167.

(3) Roucairol C, Azoulay S, Nevers MC, Crémillon C, Lavrut T, Garraffo R, Grassi J, Burger A, and Duval D. 2007. A quantitative immunoassay for plasma and intracellular atazanavir: studies of drug accumulation in cultured T-cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:405-411

Acknowledgments: We would like to thank the "Agence Nationale de Recherche sur le SIDA" for financial support

CONTACT : Laurence BOUSQUET, phone: 0033 (0)1 69 08 80 92, mail : laurence.bousquet@cea.fr



Combination of Tenofovir and Emtricitabine plus Efavirenz: *In Vitro* Modulation of MRP transporter and Intracellular Drug Accumulation.

L. BOUSQUET ¹, A. PRUVOST ¹, R. FARINOTTI ², A. MABONDZO ¹

1- CEA, iBiTec-S, Service de pharmacologie et d'Immunoanalyse, Gif sur Yvette, France
2- Département de pharmacie clinique - Faculté de pharmacie Paris XI, Châtenay-Malabry, France

CROI 2008, Boston, February 3-6, 2008

Abstract M-169

ABSTRACT

This study was performed to investigate if emtricitabine (FTC), tenofovir (TFV) and efavirenz (EFV), alone or combined, have an effect on P-glycoprotein (Pgp) and multidrug-resistance associated proteins (MRP) function in lymphocytes from healthy donors; and whether drug interaction with these transporters results in their intracellular accumulation.

Following 20-h incubation with FTC, TFV, EFV, FTC+TFV, TFV+EFV or FTC+TFV+EFV (drug concentrations were 5 μ M), functional ability was assessed by measuring fluorescent dye efflux with or without specific inhibitors. Intracellular drug concentrations were measured by liquid chromatography with mass spectrometry detection.

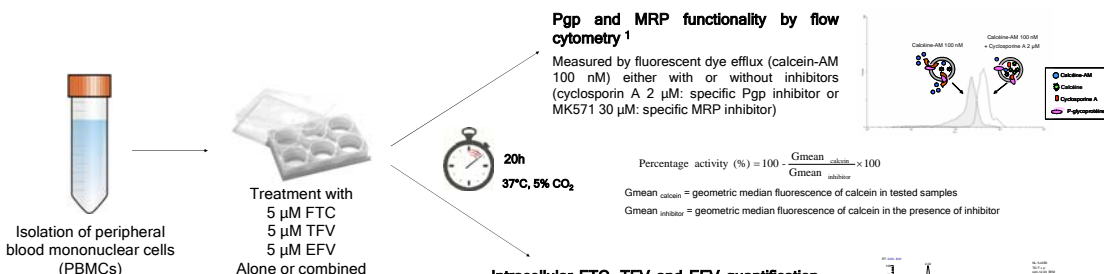
Our results showed that FTC, TFV, EFV, alone or combined, decreased MRP but not Pgp function, in lymphocytes *in vitro*. This effect was most pronounced for the combinations TFV+EFV (2.5-fold decrease) and FTC+TFV+EFV (1.9-fold decrease). Intracellular concentrations of FTC and TFV were increased in combination, especially with EFV.

INTRODUCTION

The combined administration of at least 3 anti-HIV drugs from different drug classes as highly active antiretroviral therapy (HAART) has been shown to slow the progression of disease, improve survival, and result in better virologic and immunologic responses.

ATRIPLA (Bristol-Myers Squibb and Gilead Sciences) which contains efavirenz, emtricitabine and tenofovir disoproxil fumarate (an oral prodrug of tenofovir), is the first once daily single-tablet regimen for the treatment of HIV-infected patients. The efficacy of this treatment depend on drug interactions which may limit their access to the target sites. In particular, drug absorption, distribution and elimination may be modified by active efflux transporters, like Pgp and MRPs.

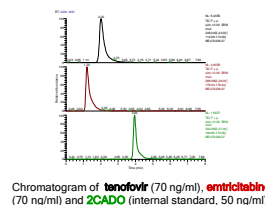
METHODS



Intracellular FTC, TFV and EFV quantification by LC-MS/MS ²

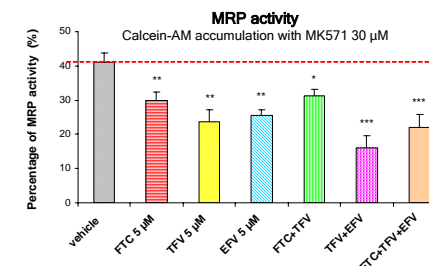
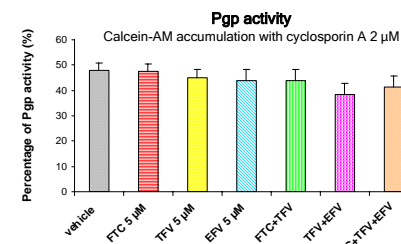
Chromatographic separation on a Phenomenex Synergi Polar-RP 4 μ m, 50 x 2 mm column thermostated at 40°C with a mobile phase comprising 0.5% formic acid and a methanol gradient delivered at a flow rate of 0.3 ml/min from 2 to 80%.

The mass spectrometry detection was performed with a triple quadrupole tandem mass spectrometer Quantum Discovery with an ESI source.



RESULTS

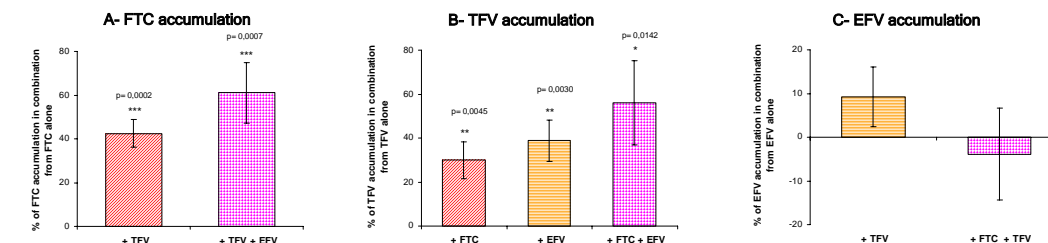
20-h treatment on lymphocyte multidrug transporter function



Data are represented as mean \pm SEM (N=7). The significance of differences between treated groups and vehicle control was evaluated by using Student's t-test. A p-value < 0.05 was considered significant. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001

FTC, TFV, EFV, alone or combined, decreased MRP but not Pgp function, in lymphocytes *in vitro*. This effect was most pronounced for the combinations TFV+EFV (2.5-fold decrease, p=0.0001) and FTC+TFV+EFV (1.9-fold decrease, p<0.0001).

Intracellular accumulation of antiretroviral in PBMCs treated for 20 h



Percent accumulation of emtricitabine (A), tenofovir (B) or efavirenz (C) in the presence of the other drugs compared with that of the control (drug alone). Data are expressed as an increase or decrease (%) in the level of drug accumulation in PBMCs, and are presented as means \pm S.E.M. (n=12). Statistical comparisons were made using two-tailed Student's t-tests (*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ns=nonsignificant).

A significant increase was demonstrated in the levels of FTC and TFV, following 20-h incubation with the combinations FTC+TFV, TFV+EFV or FTC+TFV+EFV compared with the levels seen with the individual drugs. Dose-response curves were generated for each drug in the presence of fixed concentrations of the other drugs. We show a concentration-dependent increase in FTC and TFV concentration with fixed dose of EFV, a concentration-dependent increase in FTC concentration with fixed dose of TFV and a concentration-dependent increase in TFV concentration with fixed dose of FTC.

CONCLUSION

This *in vitro* study reveals a graded decrease in MRP functionality comparing TFV, FTC and EFV, an effect correlated with the intracellular concentrations of TFV and FTC. Our findings emphasize the effectiveness of the combination therapy (TDF-FTC-EFV) currently used for the treatment of HIV-1-infected patients. The paradigm for defining a good combination therapy is the balance between efficacy and toxicity/adverse effects, and may require drug monitoring of patients during HAART.

- Legrand O., Simonin G., Perrot J.Y., Zittoun R., Marie J.P. Pgp and MRP activities using calcein-AM are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia patients. Blood. 1998 Jun 15;91(12):4480-8.
- Levi M., Pruvost A. Sensitive HPLC-ESI-MS/MS method for the simultaneous quantitative determination of Abacavir, Lamivudine and Tenofovir in human plasma. 7th international Workshop on clinical pharmacology of HIV Therapy. 20-22 April 2006. Lisbon, Portugal. Abstract 69.

anRS

CONTACT: Laurence BOUSQUET

0033 1 69 08 80 92

laurence.bousquet@cea.fr

Combination of Tenofovir and Emtricitabine plus Efavirenz: *In Vitro* Modulation of MRP Transporter and Intracellular Drug Accumulation.

L. BOUSQUET¹, A. PRUVOST¹, R. FARINOTTI², A. MABONDZO¹

¹- CEA, iBiTec-S, Service de pharmacologie et d'Immunoanalyse, Gif sur Yvette, France

²- Département de pharmacie clinique - Faculté de pharmacie Paris XI, Châtenay-Malabry, France

ABSTRACT

This study was performed to investigate if emtricitabine (FTC), tenofovir (TFV) and efavirenz (EFV), alone or combined, have an effect on P-glycoprotein (Pgp) and multidrug-resistance associated proteins (MRP) function in lymphocytes from healthy donors; and whether drug interaction with these transporters results in their intracellular accumulation.

Following 20-h incubation with FTC, TFV, EFV, FTC+TFV, TFV+EFV or FTC+TFV+EFV (drug concentrations were 5 µM), functional ability was assessed by measuring fluorescent dye efflux with or without specific inhibitors. Intracellular drug concentrations were measured by liquid chromatography with mass spectrometry detection.

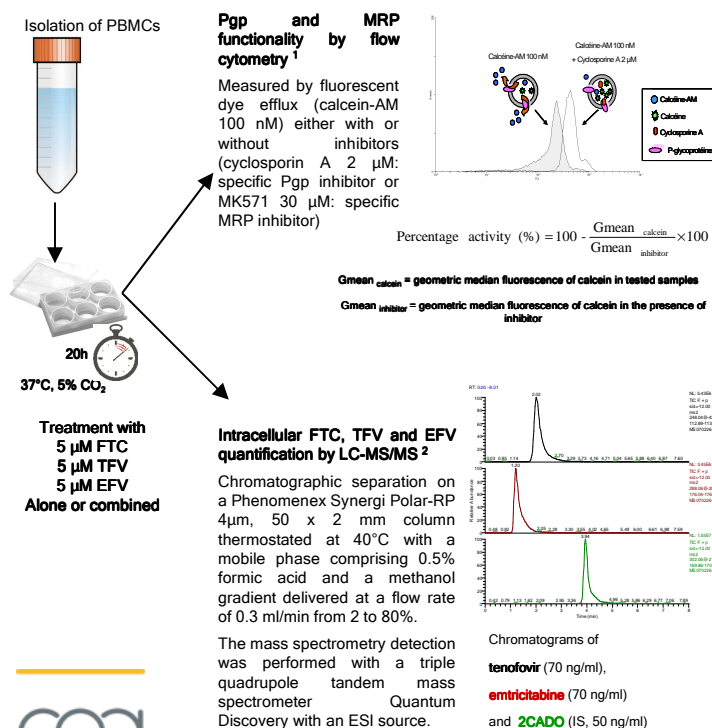
Our results showed that FTC, TFV, EFV, alone or combined, decreased MRP but not Pgp function, in lymphocytes *in vitro*. This effect was most pronounced for the combinations TFV+EFV (2.5-fold decrease) and FTC+TFV+EFV (1.9-fold decrease). Intracellular concentrations of FTC and TFV were increased in combination, especially with EFV.

INTRODUCTION

The combined administration of at least 3 anti-HIV drugs from different drug classes as highly active antiretroviral therapy (HAART) has been shown to slow the progression of disease, improve survival, and result in better virologic and immunologic responses.

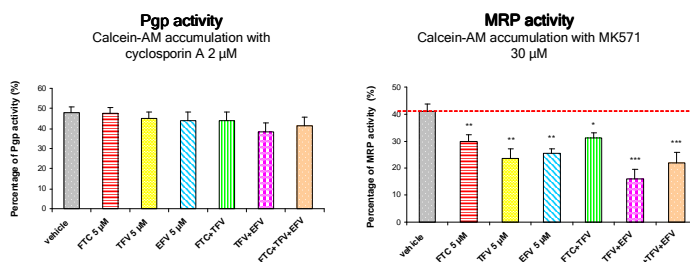
ATRIPLA (Bristol-Myers Squibb and Gilead Sciences) which contains efavirenz, emtricitabine and tenofovir disoproxil fumarate (an oral prodrug of tenofovir), is the first once daily single-tablet regimen for the treatment of HIV-infected patients. The efficacy of this treatment depend on drug interactions which may limit their access to the target sites. In particular, drug absorption, distribution and elimination may be modified by active efflux transporters, like Pgp and MRPs.

METHODS



RESULTS

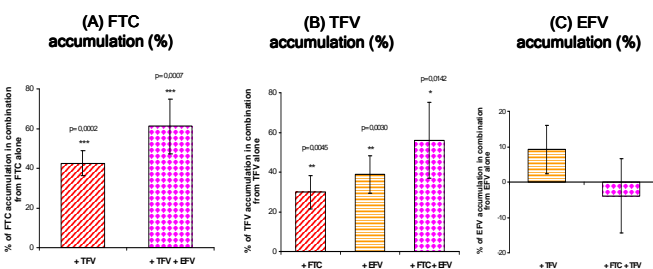
20-h treatment on lymphocyte multidrug transporter function



Data are represented as mean \pm SEM (N=7). The significance of differences between treated groups and vehicle control was evaluated by using Student's t-test. P value < 0.05 was considered significant.
*: P < 0.05, **: P < 0.01, ***: P < 0.001

FTC, TFV, EFV, alone or combined, decreased MRP but not Pgp function, in lymphocytes *in vitro*. This effect was most pronounced for the combinations TFV+EFV (2.5-fold decrease, P=0.0001) and FTC+TFV+EFV (1.9-fold decrease, P<0.0001).

Intracellular accumulation of antiretroviral in PBMCs treated for 20 h



Percent accumulation of emtricitabine (A), tenofovir (B) or efavirenz (C) in the presence of the other drugs compared with that of the control (drug alone). Data are expressed as an increase or decrease (%) in the level of drug accumulation in PBMCs, and are presented as means \pm S.E.M. (n=12). Statistical comparisons were made using two-tailed Student's t tests (*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001, ns=non-significant).

A significant increase was demonstrated in FTC and TFV levels, following 20-h incubation with either FTC+TFV, TFV+EFV or FTC+TFV+EFV combination, compared with the levels seen with each individual drugs.

Furthermore, dose-response curves were generated for each drug in the presence of other drugs growing concentrations. We show an intracellular TFV and FTC concentration increase with growing doses of EFV. FTC concentration increased with growing doses of TFV and vice versa. In all the cases, intracellular nucleosides concentration reached a plateau starting at 1µM of EFV or 5µM of the other nucleoside.

CONCLUSION

This *in vitro* study reveals a graded decrease in MRP functionality comparing TFV, FTC and EFV, an effect correlated with the intracellular concentrations of TFV and FTC. Our findings emphasize the effectiveness of the combination therapy (TDF-FTC-EFV) currently used for the treatment of HIV-1-infected patients. The paradigm for defining a good combination therapy is the balance between efficacy and toxicity/adverse effects, and may require drug monitoring of patients during HAART.

1- Legrand O., Simonin G., Perrot J.Y., Zitoun R., Marie J.P. Pgp and MRP activities using calcein-AM are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia patients. Blood. 1998 Jun 15;91(12):4480-8.

2- Levi M., Pruvost A. Sensitive HPLC-ESI-MS/MS method for the simultaneous quantitative determination of Abacavir, Lamivudine and Tenofovir in human plasma. 7th international Workshop on clinical pharmacology of HIV Therapy. 20-22 April 2006. Lisbon, Portugal. Abstract 69.